

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Biochemie a patobiochemie



**Mgr. Dana Kalábová**

Molekulární mechanismus regulace funkce kaspasy-2 pomocí proteinů 14-3-3

Molecular mechanism of 14-3-3 protein dependent regulation of caspase-2

Disertační práce

Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha, 2023



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 25.10.2023

Dana Kalábová

.....

## Poděkování

Děkuji především své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné vedení práce, konzultace, rady, motivaci a trpělivost v průběhu studia. Děkuji prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za konzultace k projektu a za vedení při krystalizaci proteinů. Děkuji spoluautorům publikací za milou spolupráci a celému kolektivu laboratoře Strukturní biologie signálních proteinů Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za pomoc a přátelskou atmosféru.

Děkuji členům Centra molekulární struktury, Biocev, konkrétně servisnímu pracovišti Hmotnostní spektrometrie, Biofyzikálních metod a Krystalizace proteinů a nukleových kyselin, za analýzu vzorků.

Děkuji rodině za podporu, svým dětem za bezmeznou trpělivost a přátelům za to, že včas rozprostřeli záchrannou síť a dodali odhodlání a energii k dokončení práce.

### **Tato disertační práce byla realizována díky finanční podpoře:**

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 17-00726S

Grantové agentury Univerzity Karlovy, projekt číslo 296216

Grantové agentury České republiky, projekt číslo 16-02739S

# **Molekulární mechanismus regulace funkce kaspasy-2 pomocí proteinů 14-3-3**

## **Abstrakt**

Kaspasa-2 je proteasa stojící apikálně v kaskádě dějů vedoucích k apoptose. Správně vedený proces apoptosy likviduje poškozené buňky, autoreaktivní lymfocyty či nadbytečné skupiny buněk v ontogenezi. Proces aktivace kaspasy-2 musí být přesně regulovaný. Jedním z popsaných způsobů regulace kaspasy-2 způsobující její inhibici je posttranslační modifikace fosforylace spojená s následnou vazbou regulačního skafoldového proteinu 14-3-3. Cílem disertační práce je vysvětlit molekulární mechanismus této regulace. Pro porozumění interakce mezi proteiny bylo nezbytné nejprve určit fosforylační místa v molekule kaspasy-2 rozpoznávaná proteinem 14-3-3 a poté popsat detailní strukturu vazebného komplexu. Struktura byla popsána řadou biochemických a biofyzikálních metod, jako je analytická centrifugace, nativní elektroforesa v TBE pufru, polarizačně fluorescenční esej, vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií či krystalizace, a výsledky vedly k podnětným závěrům. Aktivace kaspasy-2 začíná její vazbou na adaptorové proteiny, štěpením a dimerizací katalytických podjednotek. Z výsledků vyplynulo, že protein 14-3-3 může svou vazbou inhibovat aktivaci kaspasy-2 skrze blokování sekvencí nezbytných pro dimerizaci a/nebo vazbu adaptorových proteinů. Druhým možným způsobem inhibice je překrytí jaderné lokalizační sekvence kaspasy-2 a v důsledku toho vliv na translokaci kaspasy-2 do jádra buňky, kde se jako jediná z kaspas za určitých podmínek aktivuje.

## **Klíčová slova**

kaspasa-2, prokaspasa-2, 14-3-3, protein-proteinové interakce, fosforylace, jaderná lokalizační sekvence, apoptosa

# **Molecular mechanism of 14-3-3 protein dependent regulation of caspase-2**

## **Abstract**

Caspase-2 is a protease standing apically in the cascade of reactions leading to apoptosis. Properly functional apoptosis eliminates damaged cells, autoreactive lymphocytes or redundant groups of cells in ontogeny. The process of caspase-2 activation must be precisely regulated. One of the described ways of caspase-2 regulation causing its inhibition is posttranslational modification phosphorylation with subsequent binding of the regulatory scaffold protein 14-3-3. The aim of this dissertation is to explain the molecular mechanism of this regulation. To understand the interaction between the proteins, it was necessary to first identify the phosphorylation sites in the caspase-2 molecule recognized by the 14-3-3 protein and then describe the detailed structure of the binding complex. The structure was characterized by a number of biochemical and biophysical methods, such as analytical ultracentrifugation, native electrophoresis in TBE buffer, polarization-fluorescence assay, hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry, or crystallization; and the results led to stimulating conclusions. Activation of caspase-2 begins with its binding to adaptor proteins, cleavage and dimerization of the catalytic subunits. The results showed that the 14-3-3 protein can inhibit caspase-2 activation by sterically occluding of sequences necessary for dimerization and/or binding of adaptor proteins. A second possible mode of inhibition is the overlapping of the nuclear localization sequence of caspase-2 and, as a consequence, the effect on the translocation of caspase-2 into the cell nucleus, where it is the only caspase to be activated under certain conditions.

## **Keywords**

caspase-2, procaspase-2, 14-3-3, protein-protein interaction, phosphorylation, nuclear localization sequence, apoptosis

## Seznam použitých zkratk a symbolů

AANAT	serotonin N-acetyltransferasa
Apaf-1	z angl. apoptotic protease activating factor-1
ATP	adenosintrifosfát
$\beta$ -ME	$\beta$ -merkaptoethanol
Bad	z angl. Bcl-2 associated agonist of cell death
Bax	z angl. Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	z angl. B-cell lymphoma
Bid	z angl. BH3-interacting domain death agonist
C16:0 PAF	1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine
CAD	z angl. caspase-activated DNase inhibitor
CaM	kalmodulin
CaMK	kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinasa
CaMKK	kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinasa kinasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CARD	z angl. caspase recruitment domain
CDK1	cyklin-dependentní kinasa 1
DD	z angl. death domain
DISC komplexy	z angl. death-induced signaling complexes
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dp	z angl. double phosphorylated
DR4, DR5	z angl. death receptor, receptory pro TRAIL
DSF	diferenční skenovací fluorometrie
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FADD	z angl. Fas-associated death domain-containing protein
FITC	fluorescein isothiokyanát
H/D výměna	vodík/deuteriová výměna
HDX-MS	vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl ethansulfonová kyselina
ICAD	inhibitor CAD
IPTG	izopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
kaspasa	z angl. cysteinyl aspartate-specific protease

KD	z angl. kinase dead
MCS	z angl. multiple cloning site
MDM2	z angl. mouse double minute 2 homolog
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl. mass spectrometry
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK buňky	z angl. natural killer
NLS	z angl. nuclear localization sequence
NMR	nukleární magnetická rezonance
Nth1	neutrální trehalasa
p12, p19	název podjednotek kaspasy-2 odvozen od jejich molekulové váhy 12 a 19 kDa
p53	název proteinu odvozen od jeho molekulové váhy 53 kDa
PBS	z angl. phosphate buffered saline
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDB	z angl. protein data bank
PEG	polyethylenglykol
pH	z angl. potential of hydrogen
PIDD	z angl. p53 inducible gene with death domain
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa, též protein kinasa A
PP1	z angl. protein phosphatase 1
RAIDD	z angl. RIP-associated protein with death domain
RIP	z angl. receptor-interacting protein
ROS	z angl. reactive oxygen species
SAXS	z angl. small angle X-ray scattering
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SV AUC	z angl. sedimentation velocity analytical ultracentrifugation
TBE	tris-borát-EDTA
TBE-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu bez přídavku denaturačních činidel v TBE pufru
tBid	z angl. truncated Bid
TCEP	tris(2-karboxyetyl)fosfin
TEV protease	z angl. tobacco etch virus protease
TNF	z angl. tumor necrosis factor



TNF-R1	receptor pro TNF
TRAIL	z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R1, R2	receptory pro TRAIL
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
w/v	hmotnost/objem, z angl. weight/volume
wt	standardní alela, z angl. wild type

## Seznam publikací

Tato práce byla vypracována v laboratoři Strukturní biologie signálních proteinů Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i., v rámci doktorského studia na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy, a je založena na následujících publikacích, jejichž kopie jsou uvedeny v příloze:

1. **Kalabova, D.**, Smidova, A., Petrvalska, O., Alblova, M., Kosek, D., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2017. Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 493, 940–945. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.116>
2. Smidova, A.\* , Alblova, M.\* , **Kalabova, D.\***, Psenakova, K., Rosulek, M., Herman, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2018. 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. *FEBS J* 285, 4196–4213. <https://doi.org/10.1111/febs.14670>
3. **Kalabova, D.\***, Filandr, F.\* , Alblova, M., Petrvalska, O., Horvath, M., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2020. 14-3-3 protein binding blocks the dimerization interface of caspase-2. *FEBS J* 287, 3494–3510. <https://doi.org/10.1111/febs.15215>
4. Psenakova, K., Petrvalska, O., Kylarova, S., Lentini Santo, D., **Kalabova, D.**, Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T., 2018. 14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK2). *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862, 1612–1625. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.006>

\* sdílené první autorství

Další publikace autora, které nejsou podkladem pro disertační práci:

5. Alblova, M., Smidova, A., **Kalabova, D.**, Lentini Santo, D., Obsil, T., Obsilova, V., 2019. Allosteric activation of yeast enzyme neutral trehalase by calcium and 14-3-3 protein. *Physiol Res* 68, 147–160. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933950>

## Obsah

1. Literární přehled .....	13
1.1. Apoptosa .....	13
1.2. Kaspasa-2 .....	16
1.3. Proteiny 14-3-3 .....	20
1.4. CaMKK2 .....	23
2. Cíle práce .....	25
3. Metodika .....	26
3.1. Exprese a purifikace proteinů .....	26
3.1.1. Exprese a purifikace prokaspasy-2 .....	26
3.1.2. Exprese a purifikace proteinů 14-3-3 .....	27
3.1.3. Exprese a purifikace CaMKK2 .....	28
3.2. AUC .....	30
3.3. Fluorescenčně polarizační esej .....	32
3.4. Analytická gelová permeační chromatografie .....	33
3.5. Nativní elektroforesa .....	33
3.5.1. Nativní elektroforesa komplexu prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3ζ .....	33
3.5.2. Nativní elektroforesa komplexu CaMKK2 (KD) se 14-3-3γ .....	34
3.6. Limitovaná proteolýza .....	34
3.7. Vodík/deuteriová výměna (H/D výměna) spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) .....	34
3.8. Krystalografie .....	36
4. Výsledky .....	39
4.1. Charakterizace vazby prokaspasy-2 (dp) s proteinem 14-3-3ζ a 14-3-3γ .....	39
4.1.1. Příprava rekombinantní prokaspasy-2 .....	39
4.1.2. Vazebná místa Ser139 a Ser164 pro vazbu prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3ζ mají různou vazebnou afinitu .....	41
4.1.3. Dvojitě fosforylovaná kaspasa-2 spolu s dimerem proteinu 14-3-3ζ tvoří stabilní komplex .....	42
4.1.4. Pro vytvoření stabilního komplexu mezi proteiny prokaspasy-2 (dp) a dimerem proteinu 14-3-3ζ je nutná přítomnost obou fosforylovaných vazebných motivů .....	43
4.1.5. Strukturní analýza komplexu prokaspasy-2 (dp) a proteinu 14-3-3ζ .....	44
4.1.6. Vazba dimeru 14-3-3ζ chrání prokaspasu-2 před proteolytickou degradací <i>in vitro</i> .....	46
4.1.7. 14-3-3γ interaguje v komplexu s prokaspasou-2 (dp) s C-terminální částí její domény p12, která je zapojena do dimerizace kaspasové molekuly .....	46
4.1.8. Krystalová struktura komplexu 14-3-3γΔC s dvojitě fosforylovaným peptidem prokaspasy-2 pS139+pS164 .....	47

4.2. Charakterizace vazby CaMKK2 s proteinem 14-3-3 $\gamma$ .....	51
4.2.1. CaMKK2 tvoří stabilní komplex s proteinem 14-3-3 $\gamma$ , a to i v přítomnosti pouze jednoho fosforylačního místa .....	51
4.2.2. Strukturní analýza komplexu CaMKK2 s proteinem 14-3-3 $\gamma$ .....	51
5. Diskuse .....	54
6. Závěr.....	57
7. Souhrn .....	59
8. Summary .....	60
9. Literatura .....	61
10. Přílohy .....	70

## 1. Literární přehled

### 1.1. Apoptosa

Apoptosa je geneticky programovaná buněčná smrt. Je součástí tkáňové homeostasy – vyváženého vzniku a zániku buněk. Jejím cílem je eliminovat individuální buňky v organismu bez poškození struktury okolní tkáně. Pomocí apoptosy jsou v organismu odstraňovány buňky nežádoucí a přebytečné, např. během embryonálního vývoje nebo v imunitním a nervovém systému, a také jsou eliminovány buňky nádorové, napadené viry či buňky s poškozenou DNA.

Morfologické znaky apoptosy byly popsány už v roce 1972 (Kerr et al., 1972). V buňce dochází k degradaci cytoskeletu a změnám ve struktuře membrány, ke kondenzaci chromatinu, redukci velikosti jádra a k fragmentaci DNA. Poté nastává svrašnění buňky, vydouvání membrány a buňka se rozpadá na apoptotická tělíska obklopená zbytky membrány, která jsou v konečné fázi fagocytována makrofágy, aniž by došlo ke vzniku zánětlivých projevů.

O dvacet let později byla s apoptosou spjata klíčová úloha kaspas (Alnemri et al., 1996; Cerretti et al., 1992; Liu et al., 1996; Nicholson et al., 1995; Thornberry and Lazebnik, 1998). Kaspasy jsou endoproteasy s cysteinem ve svém aktivním místě, které štěpí peptidové vazby specificky za aspartátem (z angl. cysteinyl aspartate specific protease). Štěpí celou řadu proteinů v přesně řízených signálních drahách, které vedou k rozkladu buňky určené k zániku.

Kaspasy jsou v buňkách syntetizovány jako zymogeny postrádající jakoukoliv proteasovou aktivitu a setrvávají neaktivní až do obdržení specifického stimulu (Earnshaw et al., 1999). Aktivace a aktivita kaspas je vysoce regulovaná, neboť mají stěžejní roli v zániku buněk. Striktní regulace je nezbytná také proto, aby nedocházelo k neúmyslné smrti buněk. Příkladem je regulace kaspas během buněčného cyklu (Connolly et al., 2020). Kaspasy navíc fungují i v jiných neapoptotických pochodech, jako je zánět, sekrece proteinů a diferenciace (Feinstein-Rotkopf and Arama, 2009; Kuranaga and Miura, 2007; Li and Yuan, 2008; Yi and Yuan, 2009). Chyby v této jemně řízené regulaci mohou mít závažné následky. Příkladem může být studie vývoje čichových sensorických neuronů u myši, kde byla objevena neapoptotická úloha kaspasy-9 a jejího adaptorového proteinu Apaf-1 (z angl. apoptotic protease activating factor-1). Kaspasa-9 je zde zodpovědná za štěpení membránového proteinu Semaphorinu 7A, které je důležité ve formování axonálních vláken neuronů (Pasterkamp et al., 2003).

U člověka je známo patnáct kaspas (kaspasy -1 až -14, kaspasa-16) (Eckhart et al., 2008), z nichž sedm se vyskytuje v apoptotické kaskádě, zatímco ostatní souvisí se zánětem, diferenciací, sekrecí proteinů a jinými procesy (Feinstein-Rotkopf and Arama, 2009; Kuranaga and Miura, 2007; Li and Yuan, 2008; Yi and Yuan, 2009). Pro jejich velký význam v základních buněčných funkcích si geny, které je kódují, udržely v průběhu evoluce velmi konzervativní sekvence. Primární struktura kaspas se skládá z N-terminální prodomény a z C-terminální proteasové domény obsahující katalytický cystein. Proteasová doména je složena ze dvou podjednotek – velké (17-20 kDa) a malé (10-12 kDa), spojených krátkým linkerem (Taylor et al., 2008).

Podle postavení v apoptotické signální kaskádě se kaspasy dělí na iniciační a efektorové. Mezi iniciační kaspasy u člověka řadíme kaspasy -2, -8, -9 a -10. V buňkách se vyskytují jako neaktivní monomery, jejichž společným znakem je dlouhá N-terminální prodoména obsahující specifický protein-protein vazebný motiv, který slouží k vazbě adaptorových proteinů. Tyto proteiny svou vazbou na kaspasovou prodoménu zajistí přiblížení a přesnou prostorovou orientaci molekul kaspas vedoucí k jejich dimerizaci. Po dimerizaci molekul následuje jejich autokatalytické štěpení na velké a malé podjednotky a tvorba aktivních heterodimerů (Baliga et al., 2004; Boatright and Salvesen, 2003; Pop et al., 2006; Riedl and Salvesen, 2007; Wachmann et al., 2010). Efektorové kaspasy, ke kterým u člověka patří kaspasy -3, -6 a -7, mají na rozdíl od iniciačních kaspas krátkou N-koncovou prodoménu a v buňkách se vyskytují ve formě inaktivních homodimerů. Ke své aktivaci vyžadují proteolytické štěpení již aktivovanými iniciačními kaspasami (Riedl and Shi, 2004). Poté působí na stovky buněčných substrátů, které inaktivují enzymy opravující poškozenou DNA, aktivují endonukleasy, degradují membrány buněčných organel i zevní membránu buňky, hydrolyzují buněčné proteiny a degradují cytoskeletální struktury. Efektorové kaspasy mohou štěpit a aktivovat ostatní efektorové kaspasy a tím vytvořit zpětnou smyčku k posílení reakcí vedoucích k apoptose.

Proces apoptosy může být spuštěn jak vnější cestou – stimulací specifických receptorů na povrchu buňky, tak vnitřní cestou – uvolněním cytochromu c z mitochondrií. Vnějšími zásahy, které iniciují proces buněčné smrti, jsou např. ionizující záření, hypertermie, působení toxických látek, steroidních hormonů, cytokinů či oxidu dusnatého, virové infekce nebo imunitní pochody. Vnější indukci může být například akce cytotoxického (CD8+) T-lymfocyty, který se na buňku z určitého důvodu zaměří, protože je např. nádorová či virem infikovaná. Buňky imunitního systému (cytotoxické CD8+ T-lymfocyty, NK buňky) mají ve svých membránách proteiny z rodiny TNF cytokinů (z angl.

tumor necrosis factor), tzv. Fas ligandy. Spuštění vnější cesty apoptosy začíná vazbou Fas ligandu (FasL) na extracelulární doménu transmembránového receptoru buňky určené k zániku zvanou Fas receptor (FasR, receptor smrti z rodiny TNF receptorů). Vazba ligandu indukuje oligomerizaci receptoru a sdružení cytoplasmatických adaptorových proteinů FADD (z angl. Fas-associated death domain-containing protein) vázících se na intracelulární doménu receptoru (Danial and Korsmeyer, 2004; Itoh and Nagata, 1993; Trauth et al., 1989). FADD proteiny poté váží prodomény iniciátorových kaspas -8 nebo -10 a vyvolají tak jejich dimerizaci a tím aktivaci. Celé tyto indukční proteinové komplexy se nazývají DISC komplexy (z angl. death-induced signaling complexes) (Kischkel et al., 1995). Iniciátorové kaspasy -8 a -10 jsou tedy aktivovány v DISC komplexech, ve kterých se k sobě přiblíží, získají přesnou orientaci a tím se indukuje jejich dimerizace (Boatright et al., 2003; Wachmann et al., 2010). Aktivované kaspasy -8 a -10 mohou dále přímo štěpit efektorové kaspasy, jako je kaspasa-3. U některých buněk je tato cesta dostatečná pro jejich zánik. U jiných buněk musí kaspasa-8 zapojit do dalších pochodů mitochondrie a tím posílit signál k efektivní likvidaci buňky i vnitřní cestou aktivace (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Dalším příkladem dvojice ligand – receptor smrti, podobně jako FasL – FasR, jsou TNF – TNF-R1 a TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) – TRAIL-R1 (též DR4) a TRAIL-R2 (též DR5) (McIlwain et al., 2013).

Vnitřní cestou aktivace apoptosy buňka reaguje na celou řadu poškození, jako je nedostatek růstových faktorů, poškození cytoskeletu, zlomy DNA, akumulace nesprávně sbalených proteinů, hypoxie a mnoho dalších. Klíčovou rolí zde hraje protein p53, transkripční faktor, jehož hlavní funkcí je regulovat buněčnou odpověď na poškozenou DNA, včetně participace na rozpoznání genetického poškození a na regulaci jeho opravy. Současně je inhibováno dělení buňky do doby, než je poškození opraveno. Pokud změny na DNA přesahují možnost opravy, dojde k zvýšení exprese p53 a indukci syntézy dalších proteinů, které poškozují mitochondrie (Yamada and Yoshida, 2019).

Klíčovým procesem v aktivaci apoptosy vnitřní cestou je uvolnění cytochromu c, komponenty dýchacího řetězce, z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytoplasmy. Permeabilizace mitochondriální membrány je navozená a kontrolovaná proteiny Bcl-2 rodiny. Do této rodiny patří jak proteiny proapoptotické (př. Bid, Bax a Bad), tak proteiny, které apoptosu potlačují (př. Bcl-2). Vzájemný poměr těchto proteinů v buňce a jejich interakce rozhoduje, který z procesů převáží. Molekuly iniciačních kaspas v přítomnosti apoptotických stimulů štěpí molekulu cytosolického proapoptotického proteinu Bid (z angl. BH3-interacting domain death agonist) za vzniku jeho aktivní formy

označované jako tBid. Protein tBid reaguje ve vnější mitochondriální membráně s proteiny Bax a Bad, jejichž oligomerizace způsobí vznik pórů v membráně a uvolnění cytochromu c a dalších molekul do cytoplasmy (Korsmeyer et al., 2000; Wang et al., 2017).

Cytochrom c interaguje v cytoplasmě s adaptorovým proteinem Apaf-1 a změní jeho konformaci tak, aby molekuly Apaf-1 mohly vázat kaspasu-9 (Acehan et al., 2002; Boatright et al., 2003; Liu et al., 1996; Zou et al., 1997). Komplex složený z cytochromu c, sedmi molekul Apaf-1 a dvou molekul kaspasy-9 se nazývá apoptosom (Malladi et al., 2009). V tomto komplexu dojde k dimerizaci, štěpení a aktivaci kaspasy-9, která dále štěpí a tím aktivuje efektorové kaspasy -3, -6 a -7. Následuje vazba efektorových kaspas na řadu buněčných substrátů a proteolytické štěpení, které vede k morfologickým změnám a procesu apoptosy. Cílem efektorových kaspas jsou cytoskeletální proteiny (fodrin, gelsolin), jaderné laminy, proteiny mezibuněčných spojů, reparační proteiny a také ICAD, inhibitor DNA endonukleasy CAD (z angl. caspase-activated DNase inhibitor). Uvolněný aktivní CAD fragmentuje jadernou DNA.

## 1.2. Kaspasa-2

Kaspasa-2 byla objevena a popsána jako jedna z prvních savčích kaspas a její sekvence je evolučně nejvíce zakonzervována (Kumar et al., 1994; Wang et al., 1994). Její úloha v apoptose byla popsána v návaznosti na různé signální dráhy, například vnitřní dráhu aktivace apoptosy přes p53 (Lassus et al., 2002), apoptosu indukovanou reaktivními formami kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) (Braga et al., 2008), stres endoplasmatického retikula (Gu et al., 2008), dráhu apoptosy indukovanou proteinem TRAIL (Shin et al., 2005) a také v programované buněčné smrti neuronů (Madden and Cotter, 2008) a oocytů (Nutt et al., 2005). Kaspasa-2 je důležitým enzymem v regulaci buněčného cyklu (Connolly et al., 2020).

Kaspasa-2 je intenzivně zkoumána pro svou funkci tumor-supresorového proteinu (Ho et al., 2009). Působí v místě kontrolního bodu, ve kterém se rozhoduje o apoptose či přežití buňky. Potlačuje tumorigenezi cestou stabilizace proteinu p53 a tím zabraňuje hromadění poškozených buněk. Hladina proteinu p53 je regulována ubiquitin ligasou MDM2 (z angl. Mouse double minute 2 homolog) (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Momand et al., 1992). MDM2 je substrátem pro kaspasu-2, která od ligasy odštěpí N-terminální doménu a tím ji inaktivuje. Zkrácená ligasa MDM2 váže protein p53 a stabilizuje ho. Toto zjištění ukázalo, že proteinem p53 indukovaná aktivace kaspasy-2 přes skafoldový protein PIDD (viz. dále) vytváří smyčku pozitivní zpětné vazby, kdy kaspasa-2 přes



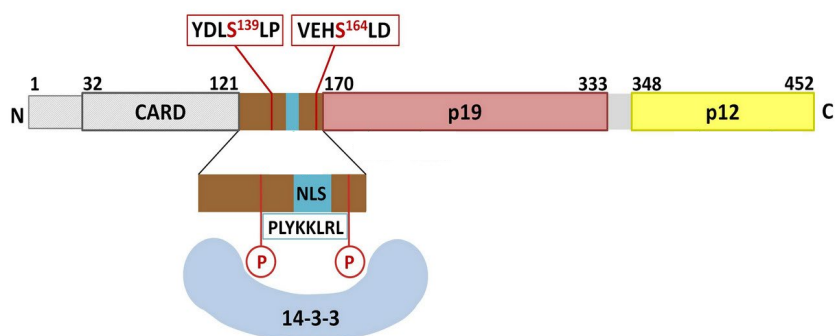
inaktivaci ubiquitin ligasy MDM2 podporuje stabilitu p53 (Baptiste-Okoh et al., 2008; Oliver et al., 2011).

Gen pro kaspasu-2 navíc leží na chromozomu 7 v úseku, který je často deletován u hematologických malignit, a snížená exprese kaspasy-2 je u těchto nemocí častým jevem (Honda et al., 2015; Kumar et al., 1995). Byla doložena u některých případech Burkittova lymfomu, lymfomu z plášťových buněk (Hofmann et al., 2001), chronické lymfocytární leukemie a akutní myeloidní leukemie (Holleman et al., 2005). U akutní myeloidní leukemie je snížená hladina kaspasy-2 spojena s lékovou resistencí a špatnou prognózou (Estrov et al., 1998). Mutace kaspasy-2 jsou vzácné, někdy jsou však spojené s rakovinou tlustého střeva, žaludku, plic a prsu (Min S. Kim et al., 2011; Min Sung Kim et al., 2011; López-García et al., 2017). Nověji byla funkce kaspasy-2 zaznamenána i v neurodegenerativních onemocněních jako jsou Alzheimerova a Huntingtonova choroba a onemocnění Lewyových tělísek (Liu et al., 2019; Smith et al., 2019; Zhao et al., 2016).

Kaspasu-2 nelze jasně zařadit do skupiny iniciačních či efektorových kaspas. Kaspasa-2 má dlouhou prodoménu zvanou CARD (z angl. caspase recruitment domain), dimerizuje a autokatalyticky se aktivuje po vazbě adaptorových proteinů, což ji řadí mezi iniciační kaspasy. Sama však neštěpí žádnou další kaspasu (kromě svého prekursoru), naopak sama je substrátem pro kaspasu-3 a slouží k amplifikaci signálu vedoucího přes tuto efektorovou kaspasu (Slee et al., 1999).

Kaspasa-2 je stejně jako ostatní kaspasy v organismu přítomna ve formě neaktivního proenzymu, který obsahuje na N-konci CARD prodoménu, následuje velká p19 a malá p12 katalytická podjednotka (obr. 1). Při aktivaci enzymu dojde k dimerizaci molekul a autoproteolýze, je odstraněna prodoména a linkery mezi doménami. Maturovaná aktivní kaspasa-2 je heterodimer složený ze dvou p19 a dvou p12 katalytických podjednotek. Struktura je stabilizována disulfidickým můstkem mezi malými podjednotkami p12. Tento disulfidický můstek je specifický pro kaspasu-2, struktury ostatních kaspas ho nemají (Schweizer et al., 2003).

Krystalová struktura kaspasy-2 ukázala molekulu dimeru s kompaktním tvarem. Aktivní místo molekuly tvoří žlábek se dvěma vazebnými místy pro substrát. Žlábek má uzavřený úzký tvar, na rozdíl od otevřeného tvaru žlábků ostatních kaspas. Centrální disulfidický můstek spojující obě podjednotky je zanořen do jádra enzymu, a tím je nepřístupný k redukčním činidlům (Schweizer et al., 2003; Tang et al., 2011) (obr. 2). Kaspasa-2 rozeznává pentapeptidovou aminokyselinovou sekvenci VDVAD, v níž

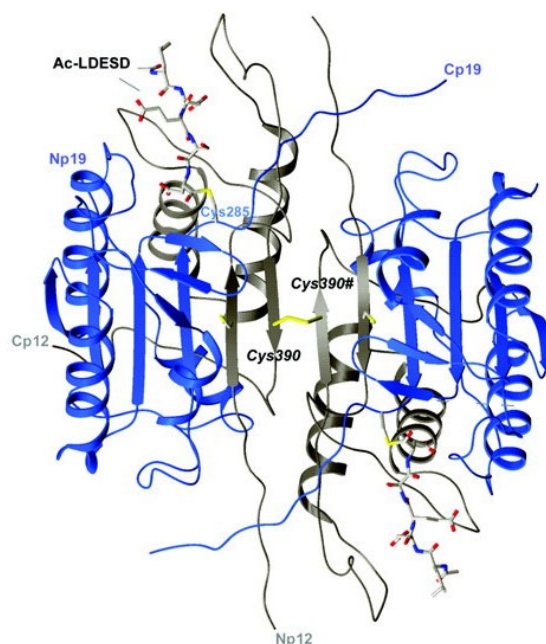


Obr. 1: Struktura molekuly prokaspasy-2. N-terminální část s prodoménou CARD – šedě, C-terminální část se dvěma katalytickými podjednotkami – velká p19 lososově, malá p12 žlutě. Linker mezi doménami CARD a p19 označený hnědou barvou obsahuje dvě fosforylační vazebná místa pro protein 14-3-3 (červeně) a jadernou lokalizační sekvenci (NLS, modře) (Smidova a kol., 2018).

absolutně závazná je pozice aspartátu na C-konci pentapeptidu (Ito et al., 1999). Preference je specifická pro kaspasu-2, ostatní kaspasy rozeznávají tetrapeptidy.

Dobře popsáním schématem aktivace kaspasy-2 je aktivace vazbou na vysokomolekulární komplex zvaný PIDDosom. Signální dráha aktivace apoptosy vedoucí od transkripčního faktoru p53 vede přes indukci skafoldového proteinu PIDD (z angl. p53 inducible gene with death domain), který navodí oligomerizaci adaptorové molekuly RAIDD (z angl. RIP-associated protein with death domain), na kterou se váže skrze strukturální motiv DD (z angl. death domain) přítomný v obou molekulách. Protein RAIDD obsahuje kromě DD také doménu CARD, přes kterou interaguje s kaspasou-2 (Duan and Dixit, 1997; Jang and Park, 2013; Tinel and Tschopp, 2004). Z pěti molekul PIDD, sedmi RAIDD a sedmi molekul kaspasy-2 vznikne prostorový útvar zvaný PIDDosom, ve kterém získají molekuly kaspasy-2 vhodnou prostorovou orientaci pro následnou autoproteolýzu (Park et al., 2007). Aktivovaná kaspasa-2 štěpí protein Bid, člena rodiny Bcl-2 proteinů s pro-apoptotickou aktivitou, přes další proteiny rodiny Bcl-2 dojde k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a aktivuje se apoptosa (Guo et al., 2002).

Nedávnými výzkumy bylo prokázáno, že kaspasa-2 může být aktivována i cestami nezávislými na tvorbě PIDDosomu, stále však vyžaduje účast molekuly RAIDD (Bouchier-Hayes et al., 2009). Z toho vyplývá, že kaspasa-2 je součástí různých buněčných drah. Kaspasa-2 byla lokalizována v jádře, cytoplasmě a v Golgiho aparátu (Baliga et al., 2003; Mancini et al., 2000). Přejít kaspasy-2 z cytoplasmy do jádra je řízen jadernou lokalizační



Obr. 2: Stužkový diagram znázorňuje dimerní molekulu kaspasy-2 se dvěma vazebnými kapsami pro substrát (peptid Ac-LDESD) včetně katalytického Cys<sup>285</sup> (číslování dle kaspasy-1). Velké podjednotky p19 – modře, malé podjednotky p12 – šedě. Cys<sup>285</sup> odpovídá v číslování dle lidské kaspasy-2 katalytickému Cys<sup>320</sup>. Cp19, Cp12, Np19, Np12 značí C- a N-konce řetězců podjednotek u jednoho monomeru. V centru molekuly je disulfidický můstek (Cys<sup>390</sup> - číslování dle kaspasy-1, odpovídá Cys<sup>436</sup> v číslování dle lidské kaspasy-2) (Schweizer a kol., 2003, PDB ID: 1PYO).

sekvencí (NLS, z angl. nuclear localization sequence, P<sup>149</sup>LYKKLRL<sup>156</sup>), která se nachází v linkeru mezi doménami CARD a p19. Je rozpoznávána molekulou heterodimeru importinu alfa/beta. Mutace Lys<sup>152</sup> v této sekvenci znemožnila translokaci kaspasy-2 do buněčného jádra a zároveň neumožnila vazbu na heterodimer importinu alfa/beta (Baliga et al., 2003). Dle dřívějších výzkumů se soudilo, že k aktivaci kaspasy-2 dochází pouze v cytoplasmě (Tinnikov and Samuels, 2013). Nedávné výzkumy však ukázaly, že k aktivaci kaspasy-2 dochází také v jádru. Autoři práce ukázali, že látky způsobující poškození DNA aktivovaly kaspasu-2 v jádru, ostatní stresové podněty (heat shock, mikrotubulární inhibitor vinkristin apod.) vedly k aktivaci kaspasy-2 v cytoplasmě. Z toho vyvodili závěr, že kaspasa-2 má dva oddělené buněčné aktivační profily (Ando et al., 2017). Dále zkoumali úlohu PIDDosomu v těchto aktivačních procesech. Použili tkáňovou kulturu myších embryonálních fibroblastů deficientních buď v genu pro PIDD nebo RAIDD a zjistili, že RAIDD je nezbytný pro jakoukoliv aktivaci kaspasy-2, v cytoplasmě, jádru i jádru, zatímco přítomnost molekuly PIDD byla specifická pouze pro aktivaci v jádru. Závěrem

Ize říci, že typ odpovědi kaspasy-2 závisí na druhu podnětu. Zásahy do buňky poškozující DNA vyvolávají aktivaci kaspasy-2 v jádru buňky prostřednictvím makromolekulárního komplexu PIDDosomu, zatímco aktivace kaspasy-2 v cytoplasmě a jádru je na formování PIDDosomu nezávislá a je odezvou na jiné podněty (Ando et al., 2017).

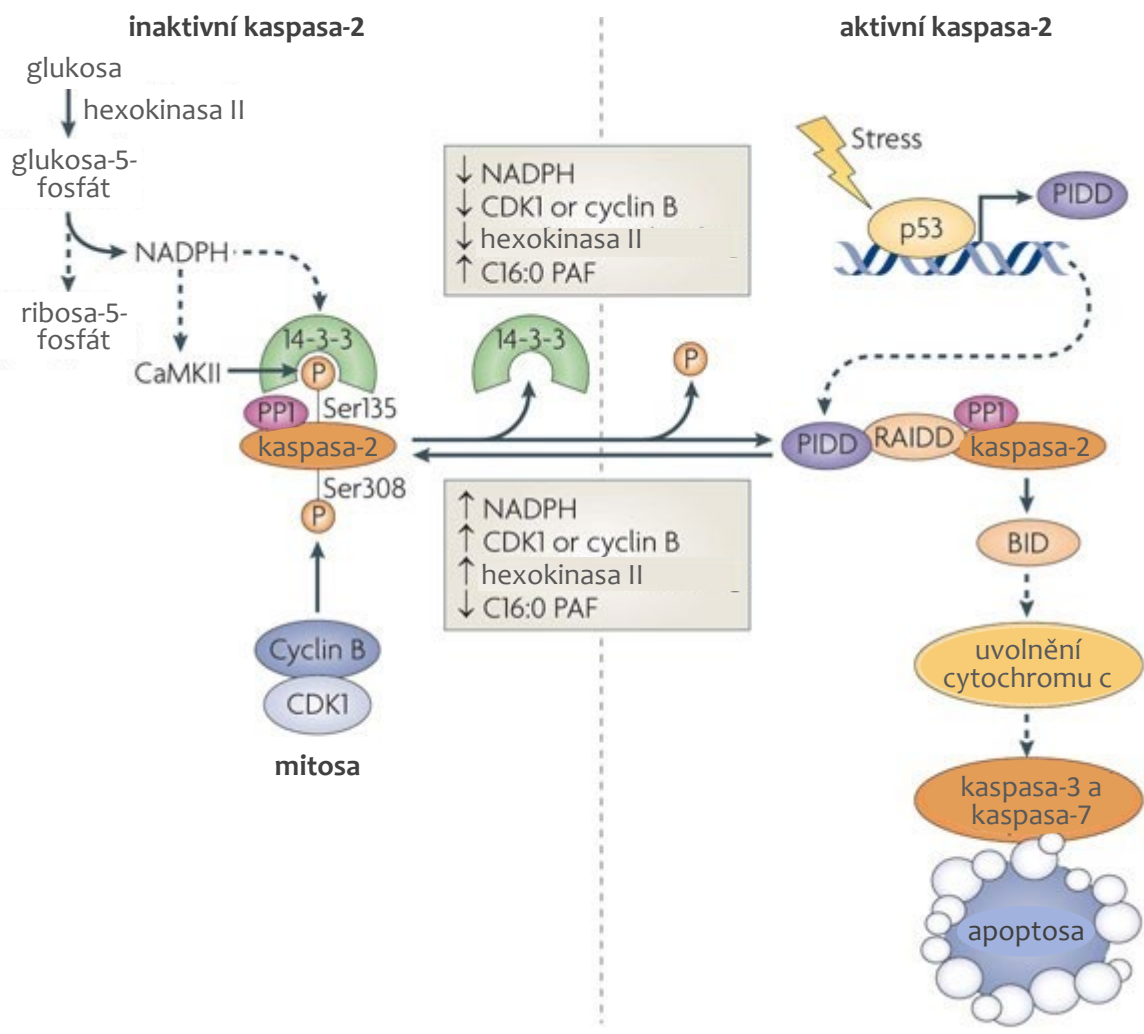
Proenzym kaspasy-2 je tedy aktivován vazbou na vysokomolekulární komplex složený z adaptorových proteinů. Avšak to, zda vůbec vstoupí prokaspasa-2 do přímé aktivace pomocí vazby adaptorových molekul, může být ovlivněno posttranslační modifikací molekuly (Parrish et al., 2013). Místa posttranslačních modifikací kaspas bývají fylogeneticky velice konzervovaná, což zdůrazňuje jejich význam při modulaci kaspasových aktivit, které ovlivňují konečný osud buňky.

Příkladem posttranslační modifikace je represe aktivace prokaspasy-2 během mitotické fáze buněčného cyklu fosforylací Ser<sup>340</sup> (u *Mus musculus*), který je lokalizován v linkeru mezi velkou a malou podjednotkou prokaspasy-2. Ser<sup>340</sup> je fosforylován pro-mitotickým kinasovým komplexem cdk1-cyklin B1 (z angl. cyclin-dependent kinase activated by cyclin B1), defosforylován je PP1 (z angl. protein phosphatase 1) (Andersen et al., 2009).

Dalším příkladem je posttranslační modifikace, která byla studována v souvislosti s inhibiční vazbou prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3. Tato vazba byla popsána v závislosti na nutriční bilanci buňky – na hladině NADPH, produktu pentosofosfátového cyklu. Dostatečná či zvýšená hladina NADPH v buňce vede k fosforylaci prokaspasy-2 na aminokyselinovém reziduu Ser<sup>135</sup> (u *Xenopus laevis*) či Ser<sup>164</sup> (u *Mus musculus*) a vazbě regulačního proteinu 14-3-3, který blokuje prokaspasu-2 v inaktivní nematurované formě. Při poklesu hladiny NADPH je 14-3-3 uvolněno z vazby s prokaspasou-2 a fosforylovaný serin je defosforylován proteinfosfátasou 1 (PP1). Proenzym kaspasy-2 je tak přístupný pro vazbu s adaptorovými proteiny a následnou aktivaci. Tento mechanismus byl objasněn v apoptose oocytů během ontogeneze u *Xenopus laevis* a později také u myši (Nutt et al., 2009, 2005) (obr. 3).

### 1.3. Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 jsou regulační bílkoviny, které reagují se svými partnery skrze fosforylované přesně definované vazebné motivy (Muslin et al., 1996). Vyskytují se v buňkách všech eukaryotických organismů, kde regulují procesy jako přenos signálu v buňce, diferenciaci a proliferaci buňky (Fantl et al., 1994), regulaci buněčného cyklu (Hermeking and Benzinger, 2006), apoptosu (Yang et al., 2001), jsou úzce spjaty s procesem vzniku

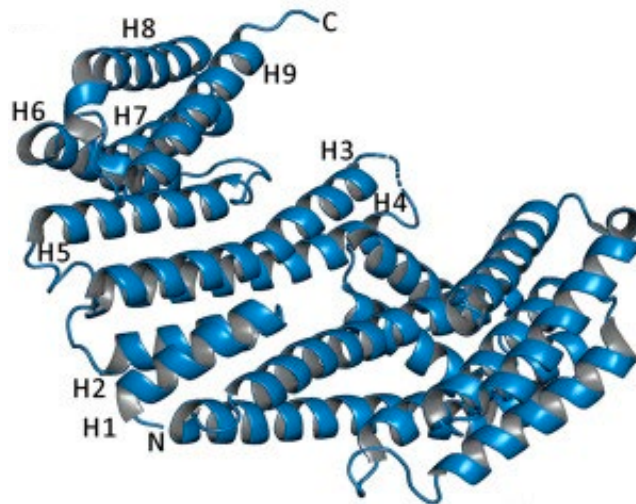


Obr. 3: Metabolická regulace kaspasy-2. Kaspasa-2 se podílí na vzájemné koordinaci buněčného metabolismu a apoptosy. Regulační mechanismy aktivace kaspasy-2 reagují na tok glukosy pentosofosfátovým cyklem a produkci NADPH. Inhibice kaspasy-2 je zprostředkována kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinásou II (CaMKII), která fosforyluje Ser<sup>135</sup> (číslování *Xenopus laevis*, odpovídá Ser<sup>164</sup> u *Homo sapiens*). Fosforylace Ser<sup>135</sup> vede k asociaci regulačního proteinu 14-3-3. S poklesem hladiny NADPH dochází k uvolnění proteinu 14-3-3 z vazby s prokaspasou-2 a Ser<sup>135</sup> je defosforylován konstitutivně vázanou proteinfosfátasou 1 (PPI). Defosforylovaná prokaspasa-2 je přístupná pro vazbu adaptorových proteinů PIDD a RAIDD a následnou aktivaci. Kromě hladiny NADPH je kaspasa-2 též citlivá na lipidový metabolit 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C16:0 PAF) a glykolytický enzym hexokinasu II. Inhibice kaspasy-2 blokuje u neuronů apoptosu vyvolanou C16:0 PAF a způsobuje tak neurotoxicitu této látky. Hexokinasa II je enzym nacházející se ve vnější mitochondriální membráně. Uvolnění hexokinasy II z mitochondrie posiluje apoptosu vyvolanou kaspasou-2. Fosforylace Ser<sup>308</sup>

(číslování *Xenopus laevis*, odpovídá Ser<sup>340</sup> u *Mus musculus*) cyklin-dependentní kinasou 1 (CDK1) inhibuje aktivaci prokaspasy-2 během mitotické fáze buněčného cyklu (převzato a upraveno z (Buchakjian and Kornbluth, 2010)).

nádorů (Tzivion et al., 2006) a mohou sloužit i jako indikátory některých neurodegenerativních onemocnění (Berg et al., 2003; Hashiguchi et al., 2000).

Proteiny 14-3-3 jsou stálé homo- nebo heterodimerní molekuly charakteristické svým tvarem a velikostí. Monomery připomínají z boku tvar písmene L, vnitřní část monomeru tvoří tzv. amfipatický žlábek, který vytváří vazebné místo pro ligand. Spojením dvou monomerních jednotek vzniká hluboká centrální dutina se dvěma vazebnými místy (obr. 4).



Obr. 4: Krystalová struktura dimeru proteinu 14-3-3 $\zeta$ . H1-H9 jsou označeny  $\alpha$ -helixy u jednoho protomeru (Rittinger et al., 1999, PDB ID: 1QJB).

U člověka je známo sedm isoform proteinů 14-3-3, které jsou si strukturně velice podobné. Liší se pozicemi monomerních jednotek, respektive úhlem mezi dvěma monomerními jednotkami (Yang et al., 2006) a délkami a konformacemi ohybů mezi helixy (Obsil and Obsilova, 2011). Isoformy se liší ve schopnosti vytvářet homo- nebo heterodimery (Liu et al., 1995). Proteiny 14-3-3 se vyskytují ve všech tkáních v těle, především ale v mozkové tkáni, dřeni nadledvinek či ve střevech (Boston et al., 1982). Jednotlivé isoformy jsou pojmenovány řeckými písmeny ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$ ).

Princip inhibice aktivace prokaspasy-2 proteinem 14-3-3 nebyl dosud objasněn. Protein 14-3-3 může měnit konformaci svého vazebného partnera, může svou vazbou

blokovat důležité signální sekvence, např. NLS, může svou vazbou udržovat molekulu substrátu ve fosforylovaném či defosforylovaném stavu nebo prostorově bránit ostatním molekulám ve vazbě k substrátu (Nutt et al., 2009; Obsil et al., 2001; Van Der Heide et al., 2004; Van Der Hoeven et al., 2000). Pro studium vazby mezi molekulami prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3 jsme zvolili řadu biofyzikálních a biochemických metod, abychom jejich interakci co nejlépe pochopili a přispěli tak k dalšímu poznání regulace kaspasy-2, důležitého apoptotického proteinu.

## 1.4. CaMKK2

Mezi proteiny, u nichž byla prokázána regulace zprostředkovaná 14-3-3, patří mnohé proteinkinasy; více než 170 kinas obsahuje fosforylační místa, o nichž je známo, že odpovídají vazebným místům 14-3-3 (Obsilova and Obsil, 2020). Vzhledem k tomu, že funkce mnoha kinas je regulována prostřednictvím protein-proteinových interakcí a tyto interakce jsou často zprostředkovány fosforylačními místy, zahrnují mimo jiné i asociace s proteinem 14-3-3.

Vápník ( $\text{Ca}^{2+}$ ) je důležitý ligand, který se váže na svůj primární intracelulární receptor kalmodulin (CaM) a spouští řadu navazujících procesů a drah. Ústředním prvkem působení  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM je aktivace vysoce konzervované kaskády  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependentních kinas (CaMK), což je rodina serin/threoninových kinas, která zesiluje signály  $\text{Ca}^{2+}$  prostřednictvím řady následných fosforylačních kaskád. Správná regulace toku  $\text{Ca}^{2+}$  je nezbytná pro systémový i buněčný metabolismus a narušení homeostázy  $\text{Ca}^{2+}$  je spojeno s různými metabolickými onemocněními a nádory (Marcelo et al., 2016).  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependentní proteinkinasy kinyasy (CaMKK) jsou serin/threonin proteinkinasy v signální kaskádě CaMK, kde fosforylují a aktivují dvě následné CaMK - CaMKI a CaMKIV (Marcelo et al., 2016). CaMKI se podílí na regulaci tvorby hipokampální paměti, neuronální migrace, přežívání buněk a synaptogeneze, zatímco CaMKIV se účastní řízení syntézy proteinů a programů genové exprese v reakci na živiny a hormony (Obsilova and Obsil, 2020). Savčí CaMKK zahrnují dvě isoformy: CaMKK1 a CaMKK2. Obě isoformy mají podobnou doménovou organizaci, tj. za katalytickou kinasovou doménou následuje C-koncový autoinhibiční segment (AIS), který se částečně překrývá s  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM vazebnou oblastí (obr. 5). Tyto isoformy CaMKK však vykazují odlišné biochemické vlastnosti. Zatímco CaMKK1 je striktně regulována způsobem závislým na  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (Tokumitsu et al., 2000), tak CaMKK2 vykazuje i značnou aktivitu nezávislou na  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (Anderson et al., 1998; Obsilova and Obsil, 2020). Tato aktivita je regulována úsekem 23 aminokyselin



ležících N-terminálně od katalytické domény a zřejmě napomáhá uvolnění autoinhibičního segmentu molekuly z katalytické domény (Tokumitsu et al., 2001).



Obr. 5: Struktura molekuly CaMKK2. N-terminální regulační oblast je označena modře, CaM vazebná oblast oranžově a fosforylační místa pro PKA červeně (převzato a upraveno z Pšenakova a kol., 2018).

Aktivita obou isoformů CaMKK je částečně inhibována fosforylací enzymem cAMP-dependentní proteinkinásou (PKA). Na molekule CaMKK1 se nachází celkem pět fosforylačních míst pro PKA Ser<sup>52</sup>, Ser<sup>74</sup>, Thr<sup>108</sup>, Ser<sup>458</sup> a Ser<sup>475</sup>. Bylo prokázáno, že fosforylace Thr<sup>108</sup> a Ser<sup>458</sup> přímo inhibuje aktivitu CaMKK1, zatímco fosforylace Ser<sup>74</sup> a Ser<sup>475</sup> umožňuje vazbu na regulační protein 14-3-3 (Davare et al., 2004; Ichimura et al., 2008). Z experimentů vyplynulo, že primárním místem pro vazbu proteinu 14-3-3 je konzervovaný motiv obsahující Ser<sup>74</sup>. Bylo navrženo i sekundární vazebné místo, a to Ser<sup>475</sup>. CaMKK2 obsahuje čtyři fosforylační místa pro PKA - Ser<sup>100</sup>, Thr<sup>145</sup>, Ser<sup>495</sup> a Ser<sup>511</sup> (číslování *Homo sapiens*). Analogická místa nutná pro vazbu proteinu 14-3-3 u CaMKK2 jsou dominantní místo Ser<sup>100</sup> a sekundární Ser<sup>511</sup>. Je známo, že proteiny 14-3-3 regulují aktivitu různých enzymů buď strukturální modulací jejich katalytických domén, nebo narušením jejich protein-proteinových interakcí (Obsil and Obsilova, 2011). Protein 14-3-3 může regulovat aktivitu kinasy CaMKK2 buď přímo strukturální změnou katalytického místa, ale také vytěsněním Ca<sup>2+</sup>/CaM z vazebné domény CaM, blokováním defosforylace inhibičního místa nebo stabilizací interakce mezi autoinhibiční doménou a katalytickou doménou. K objasnění molekulární podstaty inhibice CaMKK2 prostřednictvím 14-3-3 je potřebná strukturální analýza jejich komplexu.



## 2. Cíle práce

Cílem disertační práce bylo porozumět molekulárnímu mechanismu inhibice lidské kaspasy-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3. Pro porozumění interakce mezi dvěma proteiny je nejprve potřeba znát jejich strukturu a poté poznat strukturní změny, kterými molekula prochází po vytvoření komplexu s vazebným partnerem.

Specifickými cíli bylo:

1. Příprava stabilní a solubilní formy prokaspasy-2.
2. Příprava mutantních forem prokaspasy-2. Příprava fosforylované prokaspasy-2.
3. Identifikace fosforylačních míst v molekule prokaspasy-2 pro vazbu proteinu 14-3-3 použitím cílené mutagenese, nativní elektroforézy, analytické ultracentrifugace a hmotnostní spektrometrie.
4. Biofyzikální charakterizace interakce mezi fosforylovanou prokaspasou-2 a proteinem 14-3-3 pomocí biofyzikálních metod jako je analytická ultracentrifugace, analytická gelová permeační chromatografie, limitovaná proteolýza, fluorescenčně polarizační esej, CD spektrometrie či malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).
5. Sledování strukturních změn v molekulách prokaspasy-2 a 14-3-3 po vytvoření komplexu pomocí H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií.
6. Krystalizace proteinu 14-3-3 s fosfopeptidem prokaspasy-2 zahrnující ve své sekvenci prokázaná vazebná místa.
7. Posouzení výsledků práce a vyslovení principu mechanismu inhibice lidské prokaspasy-2 prostřednictvím proteinu 14-3-3 na základě poznání charakteru jejich protein-proteinové interakce.

## 3. Metodika

### 3.1. Exprese a purifikace proteinů

#### 3.1.1. Exprese a purifikace prokaspasy-2

Zdroj genu pro lidskou kaspasu-2 byl plasmid pcDNA3-Casp2-Flag (dar od dr. Salvesena, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, San Diego, USA). Gen v rozsahu aminokyselin 32-452, obsahující doménu CARD a obě podjednotky katalytické domény p19 a p12, byl amplifikovaný metodou PCR pomocí primerů, které obsahovaly restriční místa SacI a KpnI pro zaklonování do expresního vektoru pST39 (dar od dr. Bouří, ÚOCHB AV ČR). Konstrukt byl ověřen sekvenováním. Jelikož se tato varianta kaspasy-2 produkovala jako nerozpustný protein ve formě inkluzních tělísek, byla navržena zkrácená forma proteinu v rozsahu aminokyselin 123-452, která začínala linkerem mezi doménou CARD a p19 obsahujícím obě potenciální místa pro vazbu s proteinem 14-3-3. Pro klonování byl opět použit expresní vektor pST39 a restriční místa SacI/KpnI. Produkt byl osekvenován.

Do genu kaspasy-2 byla vnesena řada mutací. Předně to byla mutace katalytického Cys<sup>320</sup> (C320S), neboť kaspasa-2 se v průběhu produkce v *E. coli* štěpila buď autokatalyticky nebo působením bakteriálních enzymů na podjednotky p12 a p19. Získali jsme tak nematurovanou kaspasu-2 (123-452), na jejímž N-konci byl zachován linker mezi doménami CARD a p19, ve kterém se nachází předpokládaná místa pro vazbu s proteinem 14-3-3 (dále prokaspasa-2). Předpokládaná místa pro vazbu 14-3-3 Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> byla mutována na glutamát (S139E a S164E), který měl svým záporným nábojem simulovat fosforylaci těchto míst. Pro možnost fosforylovat Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> enzymem PKA byly aminokyseliny na -2. a -3. pozici od těchto serinů mutovány na Arg (Y136R, D137R, V161R a E162R). Dále byla vytvořena mutantní forma prokaspasy-2 postrádající Cys<sup>436</sup> (C436A), který tvoří disulfidický můstek mezi dvěma podjednotkami p12 v heterodimeru maturované kaspasy-2. Pro kombinaci metod využívající fluorescenci byla připravena nejprve mutantní forma prokaspasy-2 bez přítomnosti tryptofanu (W385F), která byla templátem pro jednotryptofanové mutanty F188W, F218W, F426W a Y151W. Mutace byly vytvořeny metodou PCR s komplementárními primery, které obsahovaly mutaci uprostřed své sekvence. Po degradaci methylované templátové DNA restriktázou DpnI byl PCR produkt transformován do buněk *E. coli* TOP10. Plasmidové DNA z jednotlivých bakteriálních kolonií byly sekvenovány a byly vybrány plasmidové ty s požadovanou mutací.

Prokaspasa-2 byla exprimována jako fúzní protein s C-terminální neodštěpitelnou polyhistidinovou kotvou (6x His). V expresním plasmidu pST39 jsou cílové geny zaklonovány pod T7 promotorem, který má svůj původ u bakteriofága T7. Geny z tohoto promotoru může přepisovat pouze T7 RNA-polymerasa, jejíž exprese je v genomu bakterie pod kontrolou lac promotoru a lac operátoru. Lac operátor je obsazen lac represorem, který reprimuje syntézu T7 RNA-polymerasy. V přítomnosti laktosy nebo jejího analogu, jako je izopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranozid (IPTG), je represor inaktivován, T7 RNA-polymerasa se produkuje a cílový gen je přepisován. Prokaspasa-2 byla exprimována v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) v médiu “terrific broth“ ve 30 °C 1.5 h po indukci pomocí IPTG v koncentraci 0.5 mM. Terrific broth je vysoce obohacené médium pro zvýšení výtěžnosti plasmidové DNA z *E. coli*.

Prvním krokem purifikace proteinu prokaspasy-2 byla niklová afinitní chromatografie, následována dialýzou do pufru se složením 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -ME a 10% (w/v) glycerol. Purifikace pokračovala kationtovou výměnnou chromatografií na koloně Mono S 5/50 GL v pufru se složením 50 mM kyselina citrónová, 1 mM EDTA a 2 mM DTT (pH 6.0). Protein byl z kolony uvolněn lineárním gradientem NaCl o koncentraci 0 – 1 M. Následovala gelová permeační chromatografie na koloně HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 v pufru se složením 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% (w/v) glycerol. V každém kroku purifikace byla čistota proteinu kontrolována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).

14-3-3 vazebné motivy prokaspasy-2 byly fosforylovány *in vitro* kinasou PKA 2 h při 30 °C v množství 200 U/ 1 mg proteinu prokaspasy-2 v pufru obohaceném o 0.75 mM ATP a 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Poté byla fosforylační reakce inkubována dalších 16 h při 4 °C. K oddělení přebytečného ATP byla použita metoda gelové permeační chromatografie na koloně Superdex™ 75 10/300 GL v pufru se složením 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% (w/v) glycerol. Výsledek fosforylace byl ověřen hmotnostní spektrometrií (MS) v Centru molekulární struktury, na servisním pracovišti Hmotnostní spektrometrie, Biocev.

### 3.1.2. Exprese a purifikace proteinů 14-3-3

Všechny lidské isoformy proteinu 14-3-3 ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$ ) byly klonovány do expresního vektoru pET15b, ve kterém bylo místo pro proteasu thrombin změněno mutagenézí na místo pro TEV proteasu, do míst pro restriční endonukleasy NdeI a BamHI.

Byly vytvořeny varianty isoform  $\gamma$  a  $\zeta$  zkrácené o C-terminální flexibilní segment, a to formou vnesení stop kodonu za požadovaný úsek genu (výměna Ser<sup>235</sup> za stop kodon u isoformy  $\gamma$  a Asp<sup>231</sup> u isoformy  $\zeta$ ). Pro metody využívající fluorescenci byla připravena mutantní forma proteinu 14-3-3 $\gamma$ , která neobsahovala žádné tryptofany. Byly mutovány dva Trp<sup>60</sup> a Trp<sup>233</sup> přirozeně se vyskytující v isoformě  $\gamma$  (W60F a W233F). Pro mutagenезi byl použit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) umožňující simultánní průběh několika mutagenézí v jedné reakci. Jednobodové mutace byly provedeny postupem uvedeným u prokaspasy-2. Všechny mutace byly ověřeny sekvenováním.

Proteiny 14-3-3 byly exprimovány jako fúzní proteiny s N-terminální polyhistidinovou kotvou následovanou místem pro TEV proteasu. Proteiny 14-3-3 byly produkovány v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) v LB médiu a po indukci pomocí IPTG v koncentraci 0.5 mM byly kultury pěstovány ve 30 °C přes noc. Prvním krokem purifikace byla niklová afinitní chromatografie následována dialýzou do pufru se složením 20 mM Tris pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -ME a 10% (w/v) glycerol. Po úbytku vysoké koncentrace imidazolu byla změřena koncentrace proteinu a ke vzorku byla přidána TEV proteasa pro odštěpení polyhistidinové kotvy v poměru 1 mg TEV na 30 mg proteinu. Úplnost štěpení byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Následovala dialýza do pufru se složením 20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT a 10% (w/v) glycerol a aniontově výměnná chromatografie na koloně 10/50 s Q sepharosu. Posledním krokem byla gelová permeační chromatografie na koloně HiLoad™ 26/600 Superdex™ 75 v pufru ve složení 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% (w/v) glycerol. V každém kroku purifikace byla čistota proteinu kontrolována pomocí SDS-PAGE.

### 3.1.3. Exprese a purifikace CaMKK2

Gen pro lidskou kinasu CaMKK2 v rozsahu reziduí 93-517 byl zaklonován do modifikovaného expresního vektoru pRSFDuet-1 do míst pro restriční endonukleasy BamHI a NotI. Upravený pRSFDuet-1 měl v první kazetě pro klonování proteinu (MCS, z angl. multiple cloning site, celkem má tento vektor dvě kazety pro simultánní expresi dvou proteinů) mezi N-terminální polyhistidinovou kotvou a místo pro TEV proteasu vloženu GB1 doménu proteinu G (dar od dr. Bouří, ÚOCHB AV ČR), která přispívá k solubilitě produkovaného proteinu během bakteriální exprese.

Cílenou mutagenézí byla připravena katalyticky neaktivní varianta CaMKK2 KD (z angl. kinase dead, mutace D330A). CaMKK2 obsahuje čtyři fosforylační místa pro kinasu

PKA, a to Ser<sup>100</sup>, Thr<sup>145</sup>, Ser<sup>495</sup> a Ser<sup>511</sup>. Uvažovaná místa pro vazbu s proteinem 14-3-3 byla Ser<sup>100</sup> a Ser<sup>511</sup>, druhá dvě místa byla proto mutována, aby vzhledem k jejich nestechiometrické fosforylaci nevnikla do analýz nehomogenitu. Vznikly tři mutantní varianty od wt i KD formy CaMKK2 označené CaMKK2-S<sup>100</sup> se zachovaným Ser<sup>100</sup> (T145A, S495A, S511A), CaMKK2-S<sup>511</sup> se zachovaným Ser<sup>511</sup> (S100A, T145A, S495A) a CaMKK2-S<sup>100,511</sup> se zachovanými oběma Ser<sup>100</sup> i Ser<sup>511</sup> (T145A, S495A). Pro metody využívající fluorescenci byly vytvořeny mutanty CaMKK2-S<sup>100</sup> KD obsahující vždy jeden tryptofan F390W, F366W, F337W, F291W, F267W, L140W, V475W a Y128W, a to tak, že byla nejprve vytvořena varianta bez přirozeně se vyskytujících tryptofanů (W445F, W374F) a poté bylo do této varianty vneseno vždy po jedné mutaci. Byly též připraveny katalyticky neaktivní formy substrátů pro CaMKK2, a to AMPKA2 D157A (z angl. AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2) a CAMK1D D165A (z angl. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D isoform 1). Pro potřeby záměny dvou a více mutací najednou byl použit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) umožňující simultánní průběh několika mutagenéz v jedné reakci. Jednobodové mutace byly provedeny postupem uvedeným u prokaspasy-2. Všechny mutace byly ověřeny sekvenováním.

Protein CaMKK2 a všechny jeho mutantní varianty byly exprimovány jako fúzní proteiny s N-terminální polyhistidinovou kotvou a GB1. Produkce proteinů probíhala v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) v autoindukčním médiu ZY (Studier, 2005) nejprve po dobu 5 hodin při 37 °C a poté při 20 °C přes noc. Prvním krokem purifikace byla niklová afinitní chromatografie následovaná dialýzou do pufru se složením 50 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl, 4 mM EDTA, 4 mM β-ME a 10% (w/v) glycerol. Inkubací s TEV proteasou v množství 250 U na 1 mg fúzního proteinu 1h při 30 °C došlo k odštěpení polyhistidinové kotvy a GB1. Úplnost štěpení byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Posledním krokem byla gelová permeační chromatografie na koloně HiLoad<sup>TM</sup> 26/600 Superdex<sup>TM</sup> 75 v pufru ve složení 50 mM Tris (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5 mM DTT a 10% (w/v) glycerol. V každém kroku purifikace byla čistota proteinu kontrolována pomocí SDS-PAGE.

CaMKK2-S<sup>100</sup>, CaMKK2-S<sup>511</sup> a CaMKK2-S<sup>100,511</sup> byly fosforylovány *in vitro* kinasou PKA 3 h při 30 °C a poté ještě při 4 °C přes noc v přítomnosti 0.75 mM ATP a 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Bylo použito 170 U PKA na 1 mg CaMKK2-S<sup>100</sup> a CaMKK2-S<sup>511</sup> a 340 U PKA na 1 mg CaMKK2-S<sup>100,511</sup>. Přebytečné ATP bylo odstraněno gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300 GL. Výsledek fosforylace byl ověřen MS analýzou v Centru molekulární struktury, na pracovišti Hmotnostní spektrometrie, Biocev.

### 3.2. AUC

Metodu sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace (SV AUC, z angl. sedimentation velocity analytical ultracentrifugation) jsme použili ke stanovení oligomerního stavu proteinu prokaspasy-2 a pro studium reverzibilních interakcí prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 včetně určení stechiometrie komplexu a výpočtu vazebné afinity charakterizované zdánlivou disociační konstantou  $K_D$ .

Analytická ultracentrifuga je vybavena speciálním optickým systémem pro sledování průběhu sedimentace. Na částici v odstředivém poli působí několik sil. Je to odstředivá síla  $F_{ods}$ , která je úměrná hmotnosti částice  $m$  a zrychlení  $a$ , které je dáno součinem vzdálenosti částice od středu otáčení  $r$  a druhé mocniny úhlové rychlosti otáčejícího se rotoru  $\omega$ :

$$F_{ods} = m\omega^2 r$$

V opačném směru působí na částici vztlaková síla úměrná hmotnosti roztoku  $m_0$  vytlačeného sedimentující částicí:

$$F_{vz} = -m_0\omega^2 r$$

Poslední silou je frikční (třecí) síla  $F_f$ , kterou způsobuje pohyb částice roztokem:

$$F_f = -fu$$

kde  $u$  je radiální rychlost pohybu částice od středu otáčení ke dnu a  $f$  je translační frikční koeficient. Frikční koeficient závisí na tvaru a velikosti částice; objemné a protáhlé částice mají vyšší hodnoty než částice malé a kulovité.

Pohyb částice v odstředivém poli charakterizuje sedimentační koeficient  $s$ :

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

kde  $\bar{v}$  je parciální specifický objem částice a  $\rho$  hustota roztoku, ve kterém je částice rozpuštěna.

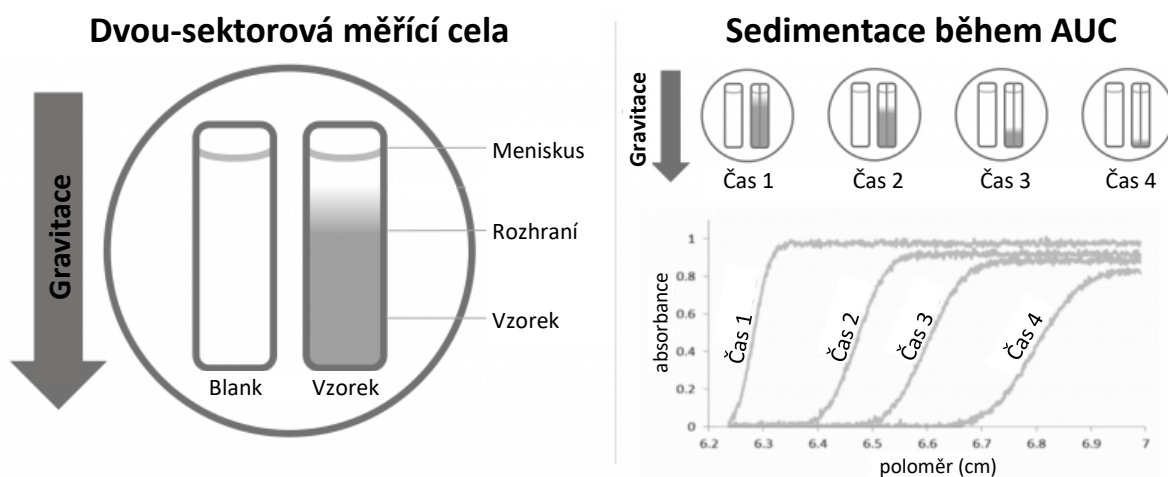
Sedimentační koeficient se udává v jednotkách Svedberg (S), který je definován jako  $10^{-13}$  sekundy. Hodnota sedimentačního koeficientu závisí na experimentálních podmínkách, na teplotě, hustotě a viskozitě pufru. Pro srovnání výsledků z různých laboratoří se extrapoluje ke standardním podmínkám (20 °C a voda ( $s_{20,w}$ )).

Sedimentaci částice v průběhu centrifugace ovlivňuje též difúze. Protichůdný difúzní tok charakterizuje translační difúzní koeficient  $D$ , související s frikčním koeficientem  $f$ :

$$D = \frac{RT}{N_A f}$$

kde  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  termodynamická teplota a  $N_A$  Avogadrova konstanta.

Při metodě sedimentační rychlosti se používají dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček. Při centrifugaci se začnou všechny částice stejnoměrně pohybovat ke dnu kyvety. Po krátké době se vytvoří pohybující se rozhraní mezi sedimentujícími částicemi a oblastí roztoku, kde se již částice nenacházejí. Toto rozhraní se pohybuje konstantní rychlostí od menisku ke dnu kyvety. Rychlost pohybu rozhraní je dokumentována sérií snímků pořízených v pravidelných časových intervalech. Vlivem difuze dochází k rozmývání rozhraní, které můžeme pozorovat jako změnu jeho tvaru ze svislého do protáhlého sigmoidálního (obr. 6). Z rychlosti pohybu a tvaru rozhraní lze určit sedimentační koeficient  $s$  a difúzní koeficient  $D$  (Brown et al., 2008).



Obr. 6: Metoda pohyblivého rozhraní při měření sedimentační rychlosti AUC. Na prvním obrázku je zobrazen průřez měřící celou s dvěma sektory. První sektor je kontrolní a je naplněn pufrům bez vzorku (blank), ve druhém sektoru je vzorek. Při centrifugaci se částice ve vzorku pohybují směrem ke dnu kyvety a vyčerpávají se z roztoku v horní části kyvety. Tím se vytváří rozhraní mezi roztokem obsahující částice a oblastí roztoku, kde se již částice nenacházejí. Během centrifugace jsou měřeny časově závislé profily koncentrací částic v celé délce měřící cely. Na druhém obrázku je znázorněn posun těchto profilů v čase, který odráží dynamiku sedimentace částic během centrifugace (převzato a upraveno z webových stránek firmy Coriolis Pharma Research GmbH, [www.coriolis-pharma.com](http://www.coriolis-pharma.com)).

Pro SV AUC analýzu prokaspasy-2 a komplexu prokaspasy-2 se 14-3-3 $\zeta$  byly nejdříve proteiny dialyzovány do pufru 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl a 1 mM TCEP.

Samotná prokaspasa-2 byla stáčena v pěti různých koncentracích od 5 do 40  $\mu\text{M}$ . Analýza směsi dvojité fosforylované prokaspasy-2 na Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> (prokaspasa-2 (dp)) a 14-3-3 $\zeta$  probíhala při molárních poměrech 5:1, 3:2, 1:2, 1:6 a 1:20 za konstantní koncentrace prokaspasy-2 (dp) 3.5  $\mu\text{M}$  a rozmezí koncentrací 0.35-35  $\mu\text{M}$  pro 14-3-3 $\zeta$ . Ze získaných časově závislých koncentračních profilů byly vypočítány spojitě distribuce sedimentačních koeficientů (tzv.  $c(s)$  distribuce) za použití programu SEDFIT (Schuck, 2000). Hodnota pozorovaného sedimentačního koeficientu byla získána integrací plochy pod vrcholem distribuce. Zdánlivá disociační konstanta byla odhadnuta přímým globálním modelováním Lammových rovnic s použitím reverzibilního vazebného modelu v programu SEDPHAT (Schuck, 2003).

### 3.3. Fluorescenčně polarizační esej

Fluorescenčně polarizační esej je založena na principu fotoselektivní excitace molekul fluoroforů polarizovaným elektromagnetickým zářením v opticky izotropním vzorku (Valeur and Berberan-Santos, 2012). Roztok fluoroforů je excitován lineárně polarizovaným zářením. Excitovány jsou ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace budícího záření. Tento dipólový moment přechodu je dán okamžitým stavem elektronového obalu molekuly a udává směr, ve kterém je světlo molekulou nejlépe absorbováno nebo emitováno. Vlivem zejména rotačních pohybů molekuly fluoroforu dochází k emitaci záření, jehož směr se neshoduje se zářením absorbovaným, záření se depolarizuje. Pokud jsou doba dohasínání fluorescence a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, pak můžeme z analýzy emisní anizotropie získat informace o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází.

Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o orientaci a pohyblivosti molekul a procesech s tím spojených, v našem případě informace o vazbě peptidů prokaspasy-2 k molekule 14-3-3 $\zeta$ .

Míru polarizace fluorescence lze vyjádřit anizotropií fluorescence ( $r$ ). Excitační polarizátor je na dráze excitačního světla a dělá z něj rovině polarizované. Emisní polarizátor (= analyzátor) je na dráze světla emitovaného. Měří se intenzita fluorescence při natočení excitačního polarizátoru vertikálně a analyzátoru vertikálně ( $\parallel$ ), následně při natočení excitačního polarizátoru vertikálně a analyzátoru horizontálně ( $\perp$ ). Ze změřených intenzit se spočítá hodnota anizotropie  $r$ :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$



V našem experimentu byly fluoroforem peptidy prokaspasy-2 označené na N-konci fluorescenčním markerem FITC (z angl. fluorescein isothiocyanate). Peptidy obsahovaly vazebné místo pro protein 14-3-3, a to buď Ser<sup>139</sup> nebo Ser<sup>164</sup> nebo obě místa najednou. Peptidy byly rozpuštěny v pufru 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% (w/v) glycerol na koncentraci 100 nM. K vzorku peptidu bylo titrováno zvyšující se množství proteinu 14-3-3ζ v rozmezí výsledné koncentrace 0 – 400 μM. Pro excitaci fluorescence byla zvolena vlnová délka absorpčního maxima fluoresceinu 490 nm a pro detekci vlnová délka jeho maximální fluorescence 520 nm. Pro každou koncentraci 14-3-3ζ byla určena hodnota ustálené anizotropie fluorescence, která byla vypočítána z naměřených intenzit podle výše uvedené rovnice.

### **3.4. Analytická gelová permeační chromatografie**

Metoda se používá k hodnocení proteinů migrujících v roztoku za nativních podmínek při zachování jejich přirozené struktury a biologické aktivity. Při gelové permeační chromatografii migrují proteiny kolonou naplněnou dextran-agarosovými polymerními kuličkami na základě své velikosti. Menší molekuly se zachycují v pórech gelových kuliček (= stacionární fáze), větší molekuly se do pórů nedostanou a jsou unášeny mobilní fází rychleji. Naším experimentem jsme chtěli doložit tvorbu komplexu mezi fosforylovanou molekulou prokaspasy-2 a proteinem 14-3-3ζ. Čtyři provedené filtrace obsahovaly postupně 6 nmol prokaspasy-2, 12 nmol 14-3-3ζ, 6 nmol prokaspasy-2 + 12 nmol 14-3-3ζ a 6 nmol prokaspasy-2 (dp) + 12 nmol 14-3-3ζ. Vzorky byly aplikované na kolonu Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300 GL s mobilní fází ve složení 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% (w/v) glycerol při normální teplotě místnosti. Alikvoty o objemu 15 μl z každé frakce byly analyzovány 15% SDS-PAGE.

### **3.5. Nativní elektroforesa**

#### **3.5.1. Nativní elektroforesa komplexu prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3ζ**

Při nativní elektroforese putují vzorky polyakrylamidovým gelem bez přídavku denaturačních činidel v TBE pufru, pH 8.3 (TBE-PAGE). Proteiny či jejich komplexy se pohybují elektrickým polem především v závislosti na svém náboji, v malé míře též v závislosti na velikosti a tvaru. Tato metoda měla za cíl prokázat tvorbu komplexů prokaspasy-2 fosforylované pouze na jednom ze dvou fosforylačních míst nebo na obou místech s proteinem 14-3-3ζ. Vzorky nanášené na gel obsahovaly jednak samotné vzorky 14-3-3ζ (240 pmol), prokaspasy-2 (120 pmol) a prokaspasy-2 (dp) a poté kombinace 14-3-

3ζ postupně s prokaspasou-2 nefosforylovanou, fosforylovanou na Ser<sup>139</sup>, na Ser<sup>164</sup> a na obou fosforylačních místech. Separace proběhla v 12% TBE-PAGE za normální teploty místnosti.

### **3.5.2. Nativní elektroforesa komplexu CaMKK2 (KD) se 14-3-3γ**

Cílem experimentu bylo ověřit tvorbu komplexů mezi variantami CaMKK2 (KD), a to CaMKK2-S<sup>100</sup>, CaMKK2-S<sup>511</sup> a CaMKK2-S<sup>100,511</sup> s proteinem 14-3-3γ. Na jeden vzorek bylo použito vždy 120 pmol CaMKK2 a 240 pmol 14-3-3γ v různých kombinacích. Separace proběhla v 12% TBE-PAGE za normální teploty místnosti.

### **3.6. Limitovaná proteolysa**

Metoda limitované proteolysy byla použita pro porovnání odhalených úseků v molekule prokaspasy-2, přístupných k proteolytickému štěpení, v molekule prokaspasy-2 samotné a v komplexu se 14-3-3. Proteolysa probíhá v nativních podmínkách za výrazného přebytku sledovaného proteinu oproti protease. Z reakce jsou v pravidelných časových intervalech odebírány alikvoty, ve kterých je proteolysa vzápětí zastavena. Produkty proteolysy jsou rozděleny v polyakrylamidovém gelu metodou SDS-PAGE a materiál v prouzcích gelu je identifikován MS analýzou.

Pro náš experiment byla použita prokaspasa-2 (dp) v množství 11.8 μg, 14-3-3ζ v množství 25.4 μg a komplex těchto enzymů. Vzorky byly štěpeny trypsinem a chymotrypsinem, váhový poměr proteasa/protein byl 1:1000. Reakce probíhala při teplotě 25 °C v pufru 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 10% (w/v) glycerol. Z reakcí byly odebírány vzorky v intervalech 0 (neštěpený protein), 10, 20 a 30 minut. Proteolytická reakce byla v odebraných vzorcích ukončena tepelnou denaturací v SDS-PAGE nanášecím pufru. Po rozdělení vzorků elektroforesou byly proužky s proteiny vyříznuty z gelu a produkty proteolytické reakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií v Centru molekulární struktury, na servisním pracovišti Hmotnostní spektrometrie, Biocev.

### **3.7. Vodík/deuteriová výměna (H/D výměna) spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)**

Výměna vodíku s deuteriem je chemická reakce, při níž je kovalentně vázaný atom vodíku (protia) nahrazen atomem deuteria. Během H/D výměny se sleduje výměna vodíků amidových skupin peptidové vazby, protože mají optimální rychlost výměny. Metoda probíhá za fyziologických podmínek, kdy proteiny zaujímají svou nativní konformaci.

Metoda dává informace o přístupnosti povrchu molekuly proteinu pro rozpouštědlo, a tím tedy informace o terciární struktuře bílkovin (Konermann et al., 2011).

Jádro deuteria je zhruba dvakrát těžší než jádro protia, protože obsahuje vedle protonu i jeden neutron. Se zvyšující se deuterací proteinu se zvyšuje i jeho molekulová hmotnost. Detekce míry deuterace je proto možná metodami hmotnostní spektrometrie. Přesnost určení místa deuterace je dána délkou peptidů, na které je protein před MS analýzou rozštěpen. Individuální peptidy jsou poté analyzovány pro celkovou deuteraci.

Pro analýzu protein-proteinových interakcí je potřeba provést H/D výměnu jednak u jednotlivých proteinů a jednak u jejich komplexu. Oblasti molekul podléhající deuteraci jsou poté porovnány. Na základě získaných dat lze usuzovat, která část molekuly změnila svou konformaci nebo je v interakci s vazebným partnerem. Je-li úsek molekuly překryt vazbou s vazebným partnerem, amidové vodíky jsou v těchto segmentech chráněny a deuterace může být v těchto místech zpomalena.

Náš experiment byl sestaven z měření fosforylované a nefosforylované prokaspasy-2, proteinu 14-3-3 $\gamma$  a jejich směsí: 14-3-3 $\gamma$  s nefosforylovanou prokaspasou-2 a 14-3-3 $\gamma$  s fosforylovanou prokaspasou-2. Proteiny byly nejprve inkubovány v koncentracích 100  $\mu$ M 14-3-3 $\gamma$  a 50  $\mu$ M prokaspasa-2 v pufru 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% glycerol při 20 °C po dobu 30 minut a poté 10x naředěny deuterovaným pufrům 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP a 10% glycerol v D<sub>2</sub>O. Z reakce byly odebrány aliquoty o objemu 20  $\mu$ l v intervalech 20 s, 2 min, 20 min, 1 h a 3 h, u kterých byl proces deuterace zastaven naředěním 5  $\times$  v 1 M glycinu/HCl pH 2.3 a zmražením v tekutém dusíku.

Před analýzou byly vzorky rychle rozmrazeny a injektovány na proteolytickou kolonu obsahující proteasu pepsin. Štěpené fragmenty byly dále posouvány mobilní fází 0.4% roztokem kyseliny mravenčí a zachyceny na hydrofobní chlazené koloně, kde došlo k jejich odsolení. Eluce odsolených peptidů byla provedena gradientem acetonitrilu a převedena na kolonu s reverzní fází za dalšího promývání acetonitrem, kde došlo k separaci peptidů s cílem minimalizovat hmotnostní překryv. Pro potlačení zpětné výměny deuteria za vodík je nutné udržovat vzorky od rozmrazení přes proteolytické štěpení až po separaci v konstantní nízké teplotě a celý proces provést v krátké době. Analytická kolona je propojena s hmotnostním spektrometrem, kde byl vzorek vaporizován, peptidy byly nabitý kladným nábojem a tříděny podle efektivních molekulových hmotností  $m/z$  (hodnota poměru hmotnosti k náboji). Posledním krokem byla detekce dopadajících iontů v čase.

Před H/D analýzou byly vytvořeny database peptidů vzniklé štěpením nedeuterovaných proteinů. Data získaná měřením byla s těmito databasemi porovnána v

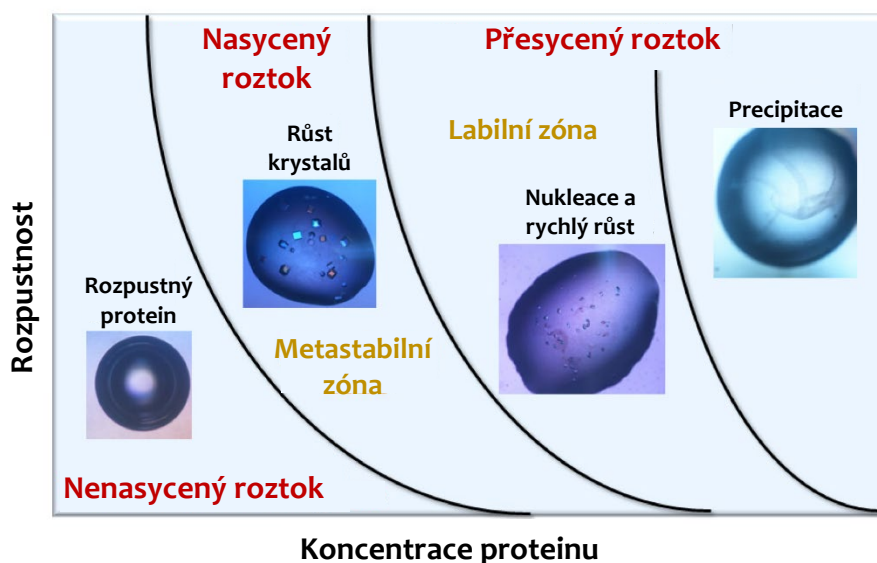
programu MASCOT (Perkins et al., 1999). Spektra částečně deuterovaných peptidů byla exportována pomocí programu DataAnalysis (Bruker Daltonics) a manuálně zpracována v programu Deutex (nepublikováno). Na základě rozdílu v deuteracním profilu byly vysledovány konformační změny při vazbě prokaspasy-2 se 14-3-3 $\gamma$  a zmapovány oblasti, které byly touto vazbou ovlivněny.

### 3.8. Krystalografie

Krystalografie proteinů je biofyzikální metoda, která se používá k určení prostorové struktury bílkovin. Celý proces můžeme rozdělit na tři části. Počáteční a základní krok je příprava proteinu, následuje krystalizace proteinu a poté probíhá difrakční experiment s analýzou dat.

Při procesu krystalizace se hledají podmínky, které vedou ke vzniku krystalů. Krystalizace proteinů probíhá ve vodném prostředí a je závislá na celé řadě faktorů, jako jsou pH, teplota, iontová síla roztoku, koncentrace jednotlivých komponent v roztoku, přítomnost aditiv, detergentů a iontů kovů, a také hlavně čistota a koncentrace proteinového vzorku. Hledají se takové parametry roztoku, které mají vliv na rozpustnost proteinu a jsou důležité při hledání hranice mezi vznikem amorfního precipitátu a tvorbou krystalu.

Podstata krystalizace spočívá v pomalém přivedení systému do stavu snížené rozpustnosti a dosažení mírného limitního stupně přesycení postupnou modifikací vlastností systému. V první fázi zvané nukleace dochází ke vzájemnému kontaktu vhodné orientovaných molekul. Při krystalizaci založené na difúzi par, kterou jsme v našem experimentu použili, se pipetují visící kapky nebo sedící kapky o objemu jednotek  $\mu\text{l}$  a umísťují se do uzavřeného prostoru s rezervoárem. Kapky obsahují roztok proteinu smíchaný v určitém poměru (např. 1:1, 1:2 či 2:1) s roztokem obsahujícím pufr, precipitační činidlo a aditivum. Rezervoár obsahuje stejný roztok pufru, precipitačního činidla a aditiva, bez roztoku proteinu. V důsledku rozdílné koncentrace roztoků dochází k transportu vody mezi kapkou proteinu a velkým objemem roztoku v rezervoáru. Při vyšší koncentraci roztoku v rezervoáru dojde ke změně objemu kapky a zakoncentrování všech jejích komponent. V nukleační fázi překročí koncentrace roztoku proteinu limit rozpustnosti, roztok se stává přesyceným a molekuly proteinu se začínají shlukovat. Protein přechází do nerozpustné fáze. Molekuly proteinu mohou vytvořit amorfní precipitát nebo založit nukleační komplex, na jehož povrch se v tzv. růstové fázi transportují ostatní molekuly proteinu a za současného vyrovnání osmolarity a ustálení rovnováhy mezi kapkou a rezervoárem krystal roste (obr. 7) (McPherson, 1999).



Obr. 7: Schematické znázornění křivky rozpustnosti proteinu v závislosti na jeho koncentraci. Zvýší-li se koncentrace roztoku proteinu nad hranici rozpustnosti, roztok se stane přesyceným. V závislosti na úrovni přesycení lze tuto zónu diagramu rozdělit na tři oblasti: velmi vysoké přesycení („precipitace“), kde molekuly proteinu tvoří amorfni agregáty, střední přesycení („labilní zóna“), kde dochází k růstu i nukleaci, a nižší přesycení („metastabilní zóna“), kde je podporován pouze růst (převzato a upraveno z (Russo Krauss et al., 2013)).

Krystaly se z kapek získávají silikonovými kličkami, obalí se v kryoprotektivním roztoku a mrazí se v tekutém dusíku. Difrakční experiment se provádí na vysokofrekvenčním zdroji rentgenového záření synchrotronu. Pro snížení radiačního poškození krystalu probíhá měření za nízkých teplot. Technikou sběru difrakčních dat je rotační (oscilační) metoda, kdy se krystal otáčí na goniostatu v proudu par kapalného dusíku. Krystal je vystaven monochromatickému svazku rentgenového záření. Rentgenové paprsky difraktují na elektronech atomů molekul tvořících krystal a difraktované paprsky jsou zachyceny detektorem.

Struktura molekuly se určuje z rozložení elektronové hustoty v krystalu. Pro metody určování trojrozměrné struktury makromolekul se využívají programy založené na Fourierově transformaci. Součástí rovnice Fourierovy syntézy je hodnota fáze, která je experimentálně neměřitelná. Fázový problém se řeší metodou izomorfního nahrazení, kdy se krystaly namáčejí v roztocích solí těžkých kovů. Kovové ionty difundují krystalem a specificky se zachytí na proteinu. Úspěšnost metody závisí na schopnosti proteinu specificky vázat těžké atomy. Další metodou je molekulové nahrazení, kdy se používá 3D struktura

strukturně podobného známého proteinu. Další metodou může být měření anomálního rozptylu při několika vlnových délkách (Rupp, 2009).

Po získání iniciálních fází a na základě chemických znalostí, stereochemie, primární aminokyselinové struktury proteinu a vázaných ligandů lze podle map elektronových hustot vystavět počáteční model, který se v dalších krocích dále upřesňuje.

V našem experimentu byla krystalována zkrácená forma proteinu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C (rezidua 1-234) s dvojitě fosforylovaným peptidem prokaspasy-2 obsahujícím oba vazebné motivy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> (pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup>). Protein 14-3-3 $\gamma\Delta$ C byl rozpuštěný v koncentraci 16 mg/ml v pufru se složením 20 mM HEPES pH 7.0, 200 mM MgCl<sub>2</sub> a 2 mM TCEP a smíchaný v poměru 2:1.1 s peptidem prokaspasy-2 pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup>. Spojením 2  $\mu$ l tohoto komplexu a 2  $\mu$ l srážecího pufru ve složení 100 mM HEPES pH 7.5, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 27% (v/v) PEG 400 a 1% (v/v) hexafluoro-2-propanol byly vytvořeny kapky, které byly ve formě visících kapek umístěné do uzavřeného prostoru s 1 ml rezervoárem. Krystalizace probíhala metodou difúze par při 20 °C. Krystaly byly zmrazeny v tekutém dusíku s kryoprotekcí v 30% glycerolu. Sběr difrakčních dat proběhl oscilační metodou na synchrotronu BESSY v Berlíně. Data byla zpracována programovými sety xds a xdsapp (Kabsch, 2010; Sparta et al., 2016). Pro určení struktury byla použita metoda molekulového nahrazení v programu MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) využívající známou strukturu 14-3-3 $\gamma$  (PDB ID: 2B05). Struktura komplexu byla upřesněna v programovém setu PHENIX (Adams et al., 2010) s výsledným rozlišením 2.75 Å, vizualizována v programu PYMOL (<https://pymol.org/2/>) a deponována v databasi PDB (z angl. Protein Data Bank) pod kódem 6SAD.

## 4. Výsledky

### 4.1. Charakterizace vazby prokaspasy-2 (dp) s proteinem 14-3-3 $\zeta$ a 14-3-3 $\gamma$

**Publikace č. 1:** Kalabova, D., Smidova, A., Petrvalska, O., Alblova, M., Kosek, D., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2017. Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 493, 940–945. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.116>

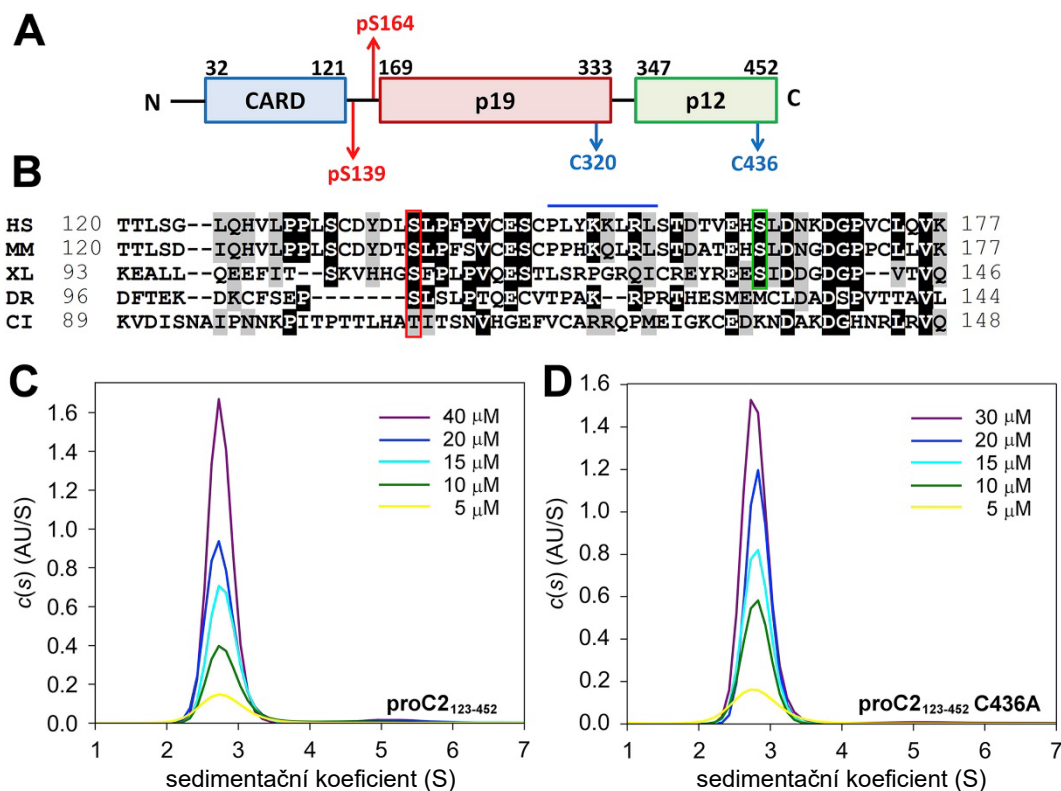
**Publikace č. 2:** Smidova, A.\*, Alblova, M.\*, Kalabova, D.\*, Psenakova, K., Rosulek, M., Herman, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2018. 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. *FEBS J* 285, 4196–4213. <https://doi.org/10.1111/febs.14670>

**Publikace č. 3:** Kalabova, D.\*, Filandr, F.\*, Alblova, M., Petrvalska, O., Horvath, M., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2020. 14-3-3 protein binding blocks the dimerization interface of caspase-2. *FEBS J* 287, 3494–3510. <https://doi.org/10.1111/febs.15215>

\* sdílené první autorství

#### 4.1.1. Příprava rekombinantní prokaspasy-2

Molekula kaspasy-2 se skládá z vazebné prodomény CARD a katalytické domény složené ze dvou podjednotek p19 a p12 (obr. 8A). Bylo potvrzeno, že kaspasa-2 z organismu *X. laevis* tvoří strukturní komplex s regulační molekulou 14-3-3, isoformou zeta (14-3-3 $\zeta$ ). Vazba molekul v komplexu je zprostředkována fosforylovaným Ser<sup>135</sup> (Ser<sup>164</sup> u lidské kaspasy) (Nutt et al., 2009). Další biochemická studie uvádí další možné místo vazby kaspasy-2 a proteinu 14-3-3 (Tinti et al., 2012), a to Ser<sup>139</sup>. Toto zjištění podporuje srovnání sekvencí mezi různými organismy, které ukazuje, že první fosforylační místo Ser<sup>139</sup> u lidské kaspasy-2 je konzervováno mezi všemi těmito sekvencemi (sekvence *C. intestinalis* má na tomto místě Thr). Fosforylační místo Ser<sup>164</sup> se vyvinulo později (obr. 8B). Předpoklad těchto dvou vazebných míst u kaspasy-2 je v souladu se skutečností, že vazební partneři 14-3-3 proteinů mívají obvykle dva fosforylované vazebné motivy, vzdálené od sebe přibližně 20 aminokyselin, které umožňují vysoce afinitní asociaci se 14-3-3 prostřednictvím vazby na oba monomery v rámci dimeru 14-3-3 (Kostecky et al., 2009; Yaffe et al., 1997).



Obr. 8: (A) Struktura molekuly kaspasy-2. (B) Srovnání sekvencí kaspasy-2 v místě předpokládaných vazebných motivů s proteinem 14-3-3 u různých organismů (HS - Homo sapiens, MM - Mus musculus, XL - Xenopus laevis, DR - Danio rerio, CI - Ciona intestinalis). V červeném rámečku Ser<sup>139</sup>, v zeleném rámečku Ser<sup>164</sup> (dle číslování Homo sapiens). (C, D) Kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  pro prokaspasu-2 a prokaspasu-2 C436A při různých koncentracích proteinu.

Pro přípravu lidské kaspasy-2 byl nejprve navržen konstrukt sestávající z aminokyselin 32-452, který obsahuje domény CARD, p19 a p12. Expres tohoto konstruktů však vedla k získání nerozpustného proteinu. Poté byl konstrukt N-terminálně zkrácen o CARD doménu a kaspasa-2 byla exprimovaná pouze v rozsahu aminokyselin 123-452. Neboť protein 14-3-3 interaguje s nematurovanou formou kaspasy-2, bylo nutné zavést do aktivního místa kaspasy-2 mutaci C320S. Tím byla zamezena maturace kaspasy-2 bakteriálními enzymy nebo autokatalytickým štěpením v průběhu její exprese v bakteriích *E. coli* (Roschitzki-Voser et al., 2012). Tento konstrukt kaspasy-2 123-452 (prokaspasa-2) poskytl stabilní expresi rozpustného proteinu v dostatečné čistotě a dostatečném množství.

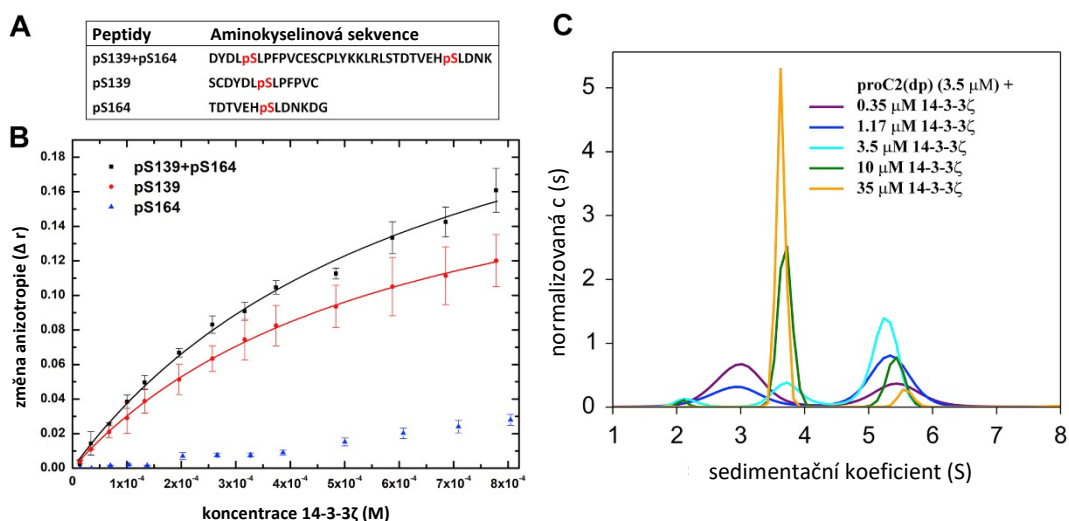
Dle krystalografické analýzy je struktura dimeru mezi dvěma molekulami kaspasy-2 stabilizována disulfidickým můstkem mezi cysteiny Cys<sup>436</sup> v malých katalytických podjednotkách (Schweizer et al., 2003). Přestože námi produkovaná molekula prokaspasy-



2 postrádala CARD prodoménu, mohla stále dimerizovat skrz tento disulfidický můstek. Byla proto připravena mutantní forma prokaspasy-2 s mutací C436A a oligomerní stav obou variant molekul byl porovnán analytickou ultracentrifugací, metodou sedimentační rychlosti (obr. 8C,D). Ze srovnání sedimentačních koeficientů obou proteinů vyplynulo, že jak mutovaná forma prokaspasy-2 s mutací C436A, tak forma se zachovaným Cys<sup>436</sup>, se vyskytují v monomerní formě, a pro další experimenty byla zvolena prokaspasa-2 bez této mutace (obr. 8C).

#### 4.1.2. Vazebná místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> pro vazbu prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3ζ mají různou vazebnou afinitu

Pro charakterizaci jednotlivých vazebných míst Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> prokaspasy-2 byly objednány fosfopeptidy vždy s jedním fosforylovaným vazebným motivem (pS<sup>139</sup> nebo pS<sup>164</sup>) a dvojnásobně fosforylovaný peptid obsahující oba vazebné motivy (pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup>) (obr. 9A), N-terminálně značené fluorescenční značkou FITC. Jejich vazba na protein 14-3-3ζ byla měřena fluorescenčně polarizační esejí. Vazba peptidu pS<sup>164</sup> byla velmi slabá. Vazba peptidu pS<sup>139</sup> byla výrazně vyšší a její hodnota dosahovala téměř vazby dvojitě fosforylovaného peptidu pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup>, jehož vazebná afinita se pohybovala v mikromolárním rozpětí (obr. 9B).



Obr. 9: (A) Aminokyselinové sekvence syntetických fosfopeptidů určených pro fluorescenčně polarizační esej. (B) Vazba fluorescenčně značených fosfopeptidů kaspasy-2 obsahujících vazebné motivy k proteinu 14-3-3 $\zeta$ . (C) Série normalizovaných distribucí c(s) pro směsi prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 $\zeta$  v různých molárních poměrech.

#### 4.1.3. Dvojitě fosforylovaná kaspasa-2 spolu s dimerem proteinu 14-3-3 $\zeta$ tvoří stabilní komplex

Pro ověření vazby proteinu 14-3-3 $\zeta$  a prokaspasy-2 bylo nutné připravit prokaspasu-2 fosforylovanou v místech Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>. Je známo, že vazebné místo Ser<sup>164</sup> je fosforylováno kinasou CaMKII (kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinasa II) (Nutt et al., 2009), kinasa fosforylující místo Ser<sup>139</sup> je zatím neznámá. Komerčně dostupná CaMKII  $\alpha$  a  $\gamma$  má však velmi nízkou specifickou aktivitu a fosforylace touto kinasou nebyla dostatečná.

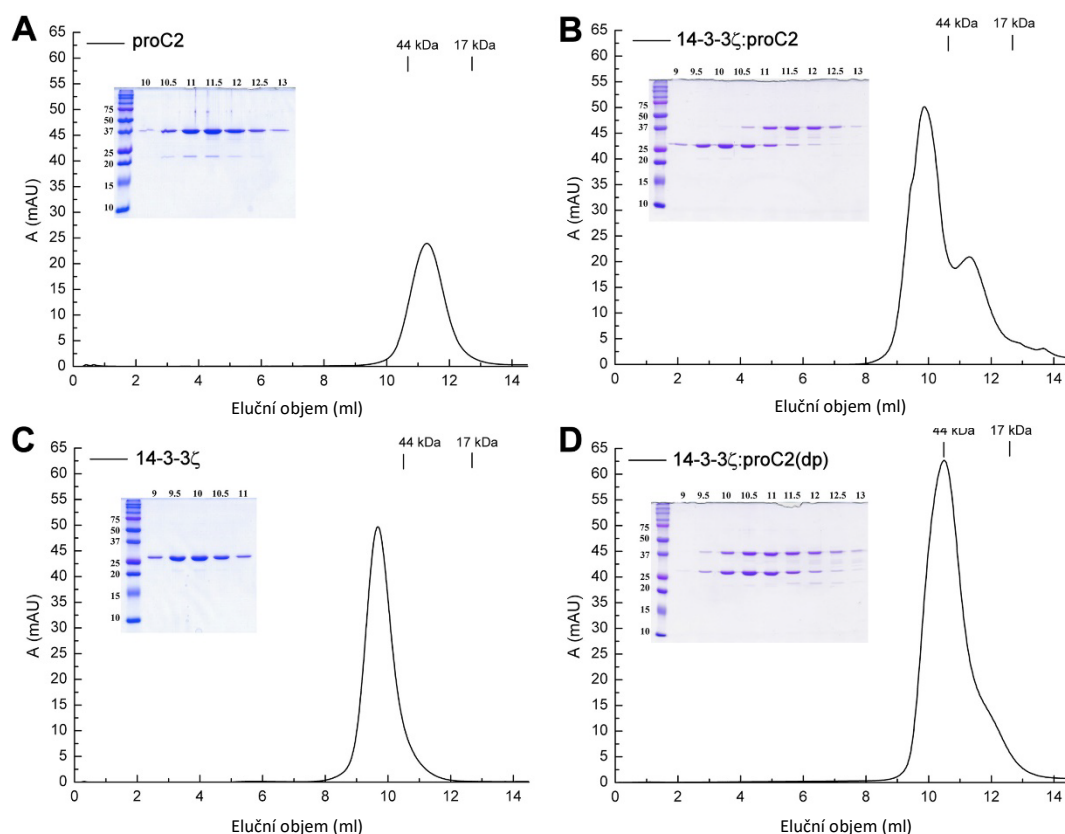
Byly proto připraveny mutanty prokaspasy-2 S139E a S164E, jak s individuální mutací, tak s oběma mutovanými místy najednou, u kterých mohou záporné náboje glutamátových reziduí mimikovat fosforylaci. Byly namíchány směsi takto mutovaných prokaspas-2 s proteinem 14-3-3 $\zeta$  a ověřeny nativní TBE-PAGE. Žádné komplexy však nebyly prokázány, záměna fosforylačního místa za reziduum kyseliny glutamové v tomto případě nebyla pro vazbu s proteinem 14-3-3 $\zeta$  dostatečná.

Pro úspěšnou fosforylaci vazebných míst v molekule prokaspasy-2 byla vazebná místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> upravena pro možnost fosforylace pomocí PKA. Byly mutovány vždy dvě aminokyseliny na 2. a 3. místě N-terminálně od Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> na rezidua argininu. Protein prokaspasy-2 byl poté úspěšně fosforylován na obou serinech Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> (dále prokaspasa-2 (dp)) a fosforylace byla ověřena MS analýzou.

Komplex proteinů 14-3-3 $\zeta$  a prokaspasy-2 fosforylované na obou vazebných místech byl studován metodou SV AUC. Byla sledována distribuce částic ve směsi prokaspasy-2 (dp) o koncentraci 3.5  $\mu$ M v kombinaci se zvyšujícími se koncentracemi proteinu 14-3-3 $\zeta$  v hodnotách 0.35 – 35  $\mu$ M. Z analýzy distribuce  $c(s)$  vyplynulo, že tyto dva proteiny spolu tvoří komplex s hodnotou sedimentačního koeficientu 5.8 S (vypočítáno ze směsi s nejvyšším molárním poměrem 14-3-3 $\zeta$ : prokaspasa-2 (dp)). Samotné molekuly proteinu 14-3-3 $\zeta$  nevázané v komplexu migrovaly se sedimentačním koeficientem 3.8 S a molekuly prokaspasy-2 (dp) se sedimentačním koeficientem 3.0 S. Z molekulové hmotnosti komplexu  $\sim$ 110 kDa odpovídající sedimentačnímu koeficientu 5.8 S byl určen stechiometrický poměr molekul v komplexu 1:2, kdy jedna molekula prokaspasy-2 (dp) se váže k dimeru 14-3-3 $\zeta$ . Byla také určena hodnota zdánlivé disociační konstanty proteinového komplexu  $K_D$  230  $\pm$  30 nM. Měření a analýzu výsledků provedla Olivia Petrvalská (obr. 9C).

Tvorba komplexu proteinů prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 $\zeta$  byla též sledována gelovou permeační chromatografií za nativních podmínek. Eluce směsi nefosforylované prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 $\zeta$  ve stechiometrickém poměru 1:2 ukázala dva překrývající se, avšak

zřetelně odlišené individuální vrcholy. Oproti tomu molekuly ve směsi prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 $\zeta$  migrovaly jako částice stejné velikosti a na chromatogramu ukázaly jeden vrchol. Z výsledku experimentu vyplývá, že prokaspasa-2 (dp) tvoří s proteinem 14-3-3 $\zeta$  stabilní komplex (obr. 10).

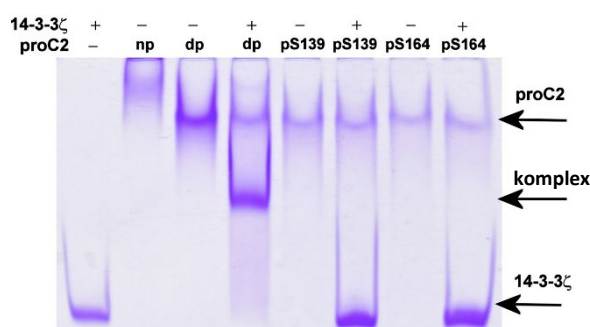


Obr. 10: Gelová permeační chromatografie. (A) prokaspasa-2 (B) Směs prokaspasy-2 a 14-3-3 $\zeta$  v molárním poměru 1:2 (C) 14-3-3 $\zeta$  (D) směs prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 $\zeta$ . Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

#### 4.1.4. Pro vytvoření stabilního komplexu mezi proteiny prokaspasy-2 (dp) a dimerem proteinu 14-3-3 $\zeta$ je nutná přítomnost obou fosforylovaných vazebných motivů

Pro objasnění přínosu jednotlivých fosforylovaných serinů Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> do vazby prokaspasy-2 a proteinu 14-3-3 $\zeta$  byly vytvořeny další dva konstrukty prokaspasy-2 vždy pouze s jedním vazebným místem mutovaným pro fosforylaci pomocí PKA. Míra fosforylace tří připravených proteinů prokaspasy-2, s fosforylovaným Ser<sup>139</sup> nebo Ser<sup>164</sup> nebo s oběma místy najednou, byla nejprve ověřena metodou hmotnostní spektrometrie. Formování komplexu s proteinem 14-3-3 $\zeta$  bylo ověřeno nativní TBE-PAGE. Komplex se vytvořil pouze u varianty, kde byly přítomny oba fosforylované seriny Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>.

Přítomnost pouze jednoho fosforylačního místa byla pro vytvoření stabilního komplexu nedostatečná (obr. 11).



Obr. 11: Nativní TBE-PAGE. Interakce 14-3-3 $\zeta$  s prokaspasou-2 fosforylovanou na Ser<sup>139</sup>, na Ser<sup>164</sup> anebo na obou serinech Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>.

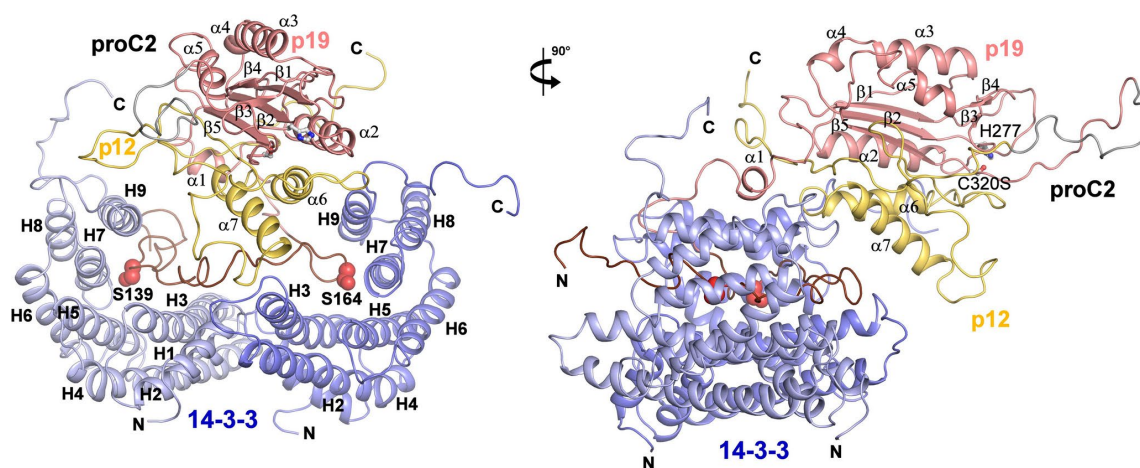
#### 4.1.5. Strukturní analýza komplexu prokaspasy-2 (dp) a proteinu 14-3-3 $\zeta$

V předchozí práci byla navržena a potvrzena dvě vazebná místa nacházející se v linkeru mezi CARD a p19 doménou kaspasy-2, která se účastní vazby mezi tímto proteinem a proteinem 14-3-3 $\zeta$ . Mezi těmito vazebnými místy se též nachází jaderná lokalizační sekvence (NLS). Protein 14-3-3 může mít proto také vliv na regulaci lokalizace kaspasy-2 v buňce.

Pro strukturní analýzu komplexu prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 $\zeta$  byly zvoleny metody maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS, z angl. small angle X-ray scattering) a metoda chemického zesílení proteinů v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou analýzou; a dále metody fluorescenční spektroskopie. Na vypracování těchto metod se podílely spoluautorky Aneta Šmídová a Miroslava Alblová ve spolupráci s Centrem molekulární struktury, servisním pracovištěm Hmotnostní spektrometrie, Biocev, a s Fyzikálním ústavem UK v Praze, oddělení Biofyziky. Strukturní model proteinového komplexu vypracovala vedoucí projektu RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Mým úkolem bylo připravit pět mutantních konstruktů prokaspasy-2, které obsahovaly jednotlivá tryptofanová rezidua na strategických pozicích v molekule prokaspasy-2. Standardní (wt, z angl. wild type) sekvence molekuly prokaspasy-2 obsahuje jeden tryptofan. Pro získání molekuly zcela bez tryptofanů bylo toto reziduum nejprve mutováno na fenylalanin a poté byly vneseny tryptofanové mutace po jedné na žádoucí pozice. Byla též připravena varianta molekuly 14-3-3 $\zeta$  bez tryptofanů, vnesením dvou záměnných mutací tryptofanů za fenylalaniny.

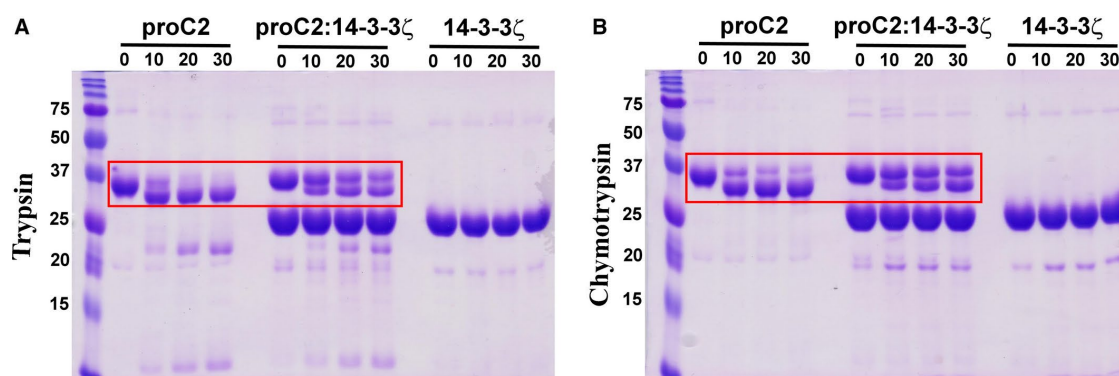
Kombinací již objasněných krystalových struktur 14-3-3 $\zeta$  (PDB ID: 1QJB) a kaspasy-2 (PDB ID: 3R7S) a výsledků našich experimentů byl získán strukturní model komplexu prokaspasy-2 a 14-3-3 $\zeta$ . V tomto modelu se domény prokaspasy-2 p19 a p12 nachází v centrálním žlábků 14-3-3 dimeru a helix  $\alpha 7$  z domény p12 interaguje s kličkou mezi helixy H3 a H4 proteinu 14-3-3 $\zeta$ . N-terminální část prokaspasy-2, která obsahuje oba vazebné motivy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> včetně jaderné lokalizační sekvence, je také zanořena v centrálním žlábků 14-3-3 $\zeta$ , a to tak, že NLS je sevřena mezi dnem žlábků a helixy  $\alpha 6$  a  $\alpha 7$  prokaspasové domény p12. Pozice domén p12 a p19 prokaspasy-2 jsou zjevně stabilizovány interakcí s helixy H9 obou protomerů 14-3-3 $\zeta$  (obr. 12). Tento model podporuje předpoklad, že na vazbě prokaspasy-2 a 14-3-3 $\zeta$  se nepodílejí pouze vazebná fosforylační místa v N-terminální oblasti prokaspasy-2, ale i ostatní oblasti obou molekul. Tento předpoklad vychází z rozdílných naměřených hodnot vazebných afinit jednak pro peptidy, které obsahovaly pouze vazebná fosforylační místa a jejichž hodnoty disociačních konstant  $K_D$  komplexu se 14-3-3 $\zeta$  se pohybovaly v mikromolárním rozpětí, a jednak pro prokaspasu-2 (dp) 123-452, u které byla hodnota disociační konstanty proteinového komplexu  $K_D$   $230 \pm 30$  nM.



Obr. 12: Strukturní model komplexu prokaspasy-2 (dp) s dimerem 14-3-3 $\zeta$ . Protomery 14-3-3 vyobrazeny modře. Strukturní části prokaspasy-2: N-terminální část je znázorněna hnědě, doména p19 lososově a p12 žlutě. Vazebná fosforylační místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> jsou znázorněna jako červené koule. Helixy 14-3-3 $\zeta$  jsou popsány velkými písmeny latinské abecedy, zatímco helixy a  $\beta$ -skládané listy prokaspasy-2 písmeny řecké abecedy.

#### 4.1.6. Vazba dimeru 14-3-3 $\zeta$ chrání prokaspasu-2 před proteolytickou degradací *in vitro*

Experiment využívající metodu limitované proteolýzy byl zvolen pro potvrzení hypotézy, že dimer 14-3-3 $\zeta$  zcela obklopující N-terminální část molekuly prokaspasy-2, která obsahuje dvě vazebná místa a jadernou lokalizační sekvenci, by měl tento úsek molekuly prokaspasy-2 chránit i před proteolýzou. Byla provedena limitovaná proteolýza jak samotných proteinů, tak jejich komplexu, enzymy trypsinem a chymotrypsinem v postupných časových intervalech. Samotný protein 14-3-3 $\zeta$  byl k oběma proteasám zcela rezistentní. Samotná prokaspasa-2 byla velmi sensitivní k proteolytické degradaci trypsinem i chymotrypsinem, vazba 14-3-3 $\zeta$  však její proteolýzu značně potlačila. Analýza štěpených fragmentů metodou hmotnostní spektrometrie ukázala, že místo rozštěpení aminokyselinového řetězce prokaspasy-2 bylo za Arg<sup>155</sup>. Místo se nachází na spojnici mezi oběma vazebnými fosforylačními místy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> a je součástí NLS. Toto místo bylo vazbou proteinu 14-3-3 $\zeta$  kryto a chráněno a proteolýza zde byla zpomalena (obr. 13).



Obr. 13: Limitovaná proteolýza prokaspasy-2 samotné a v komplexu s proteinem 14-3-3 $\zeta$  enzymy trypsinem (A) a chymotrypsinem (B) v časových intervalech 0, 10, 20 a 30 minut.

#### 4.1.7. 14-3-3 $\gamma$ interaguje v komplexu s prokaspasou-2 (dp) s C-terminální částí její domény p12, která je zapojena do dimerizace kaspasové molekuly

Strukturní analýza komplexu prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 $\zeta$  ukázala, že molekuly prokaspasy-2 a 14-3-3 $\zeta$  spolu v komplexu interagují nejen skrz dvě vazebná fosforylační místa, ale také ostatními částmi obou molekul. Takovou částí je i C-terminální část domény p12 prokaspasy-2, která je zodpovědná za dimerizaci, kterou začíná aktivace prokaspasové molekuly. Pro potvrzení předpokladu, že protein 14-3-3 blokuje sekvenci prokaspasy-2, která je nezbytná pro její dimerizaci, a tím se podílí na regulaci aktivace prokaspasy-2, byla zvolena metoda H/D výměny spojená s hmotnostní spektrometrií.

Pro tuto metodu byla nejprve vybrána vhodná isoforma proteinu 14-3-3. Dle výsledků metody fluorescenčně polarizační eseje, metody diferenční skenovací fluorometrie (DSF) a metody SV AUC byla vybrána isoforma gama proteinu 14-3-3 ve své standardní délce, neboť tato isoforma tvořila s fosfopeptidem prokaspasy-2 pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup> nejstabilnější komplex. Měření DSF provedla Miroslava Alblová a měření SV AUC Olivia Petřalská.

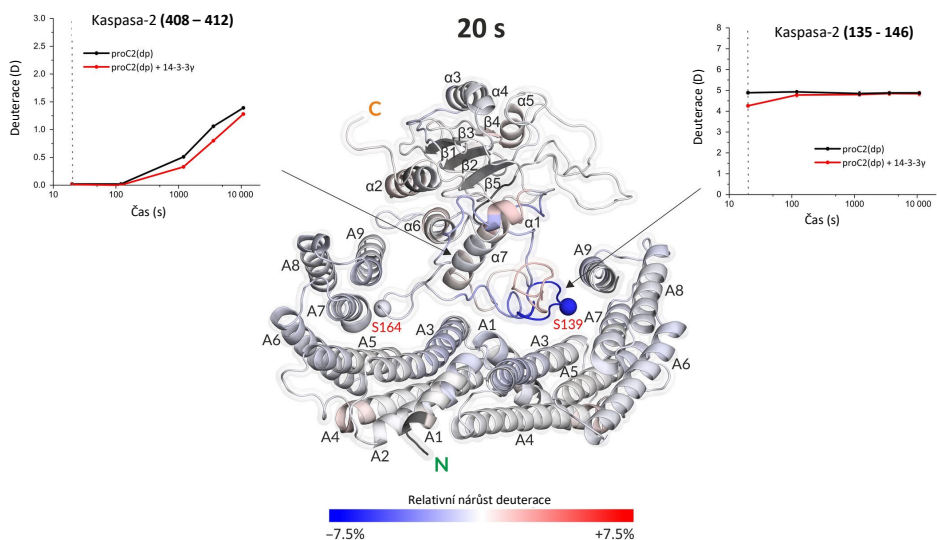
Metoda H/D výměny spojená s hmotnostní spektrometrií ukázala úseky molekuly prokaspasy-2, ve kterých nastaly konformační změny po fosforylaci molekuly, a úseky, které v případě vytvoření komplexu se 14-3-3 $\gamma$  odolávají změnám a jsou tedy zahrnuté v protein-proteinové interakci. Porovnání výsledků deuterizace nefosforylované prokaspasy-2 a prokaspasy-2 (dp) ukázalo na konformační změny způsobené fosforylací v úseku fosforylačního místa Ser<sup>139</sup> (135-146), kde byla pozorována pomalejší izotopová výměna. Měření deuterizace prokaspasy-2 (dp) v komplexu se 14-3-3 $\gamma$  zaznamenalo další pokles izotopové výměny oproti samotné prokaspase-2 (dp), a to jak v již zmiňovaném úseku Ser<sup>139</sup> (135-146), tak také v doméně p12 (408-413), což svědčí o protekci těchto úseků prokaspasy-2 (dp) vazbou se 14-3-3 $\gamma$  (obr. 14). Neboť úsek aminokyselin 408-413 tvoří C-terminální helix domény p12, který je zapojený do dimerizace molekuly prokaspasy-2 (Schweizer et al., 2003; Tang et al., 2011), můžeme usuzovat, že vazba 14-3-3 $\gamma$  na molekulu prokaspasy-2 má inhibiční vliv na její dimerizaci a tím i aktivaci. Měření HDX-MS a její analýzu provedli František Filandr a Petr Man z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Biocev. Mým úkolem bylo připravit proteiny prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 $\gamma$  v dostatečné čistotě a potřebných koncentracích.

#### **4.1.8. Krystalová struktura komplexu 14-3-3 $\gamma$ $\Delta$ C s dvojitě fosforylovaným peptidem prokaspasy-2 pS139+pS164**

Přes všechny biofyzikální a biochemické metody nebylo dosud popsáno, jak se konkrétně váže úsek prokaspasy-2, který zahrnuje fosforylační místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> a linker mezi těmito dvěma místy obsahující NLS, k proteinu 14-3-3. Proto bylo vhodné vyřešit krystalovou strukturu komplexu dvojitě fosforylovaného peptidu prokaspasy-2 obsahujícího tato místa s proteinem 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C.

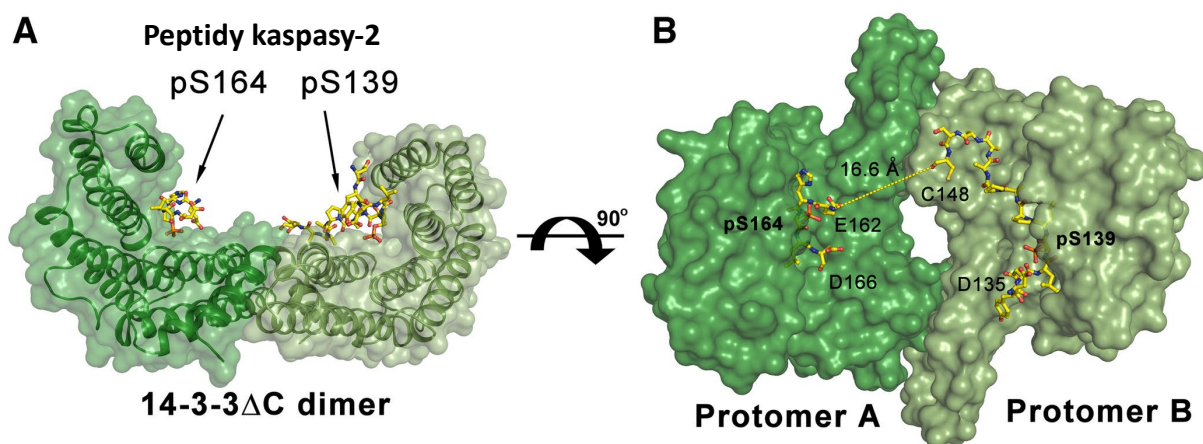
14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C (rezidua 1-234) je zkrácená forma proteinu 14-3-3 $\gamma$  o C-terminální flexibilní úsek, který je neuspořádaný a v krystalových strukturách neviditelný. Fosfopeptid prokaspasy-2 byl dlouhý 34 aminokyselin v rozsahu Asp<sup>135</sup> – Lys<sup>168</sup>. Podařilo se vyřešit krystalovou strukturu tohoto komplexu s rozlišením 2.7 Å. Dostatečná elektronová densita





Obr. 14: HDX-MS - vazebné rozhraní molekul prokaspasy-2 (dp) a 14-3-3 $\gamma$ . Zmapované změny v kinetice deuterizace u molekuly prokaspasy-2 (dp) po zformování komplexu se 14-3-3 $\gamma$ .

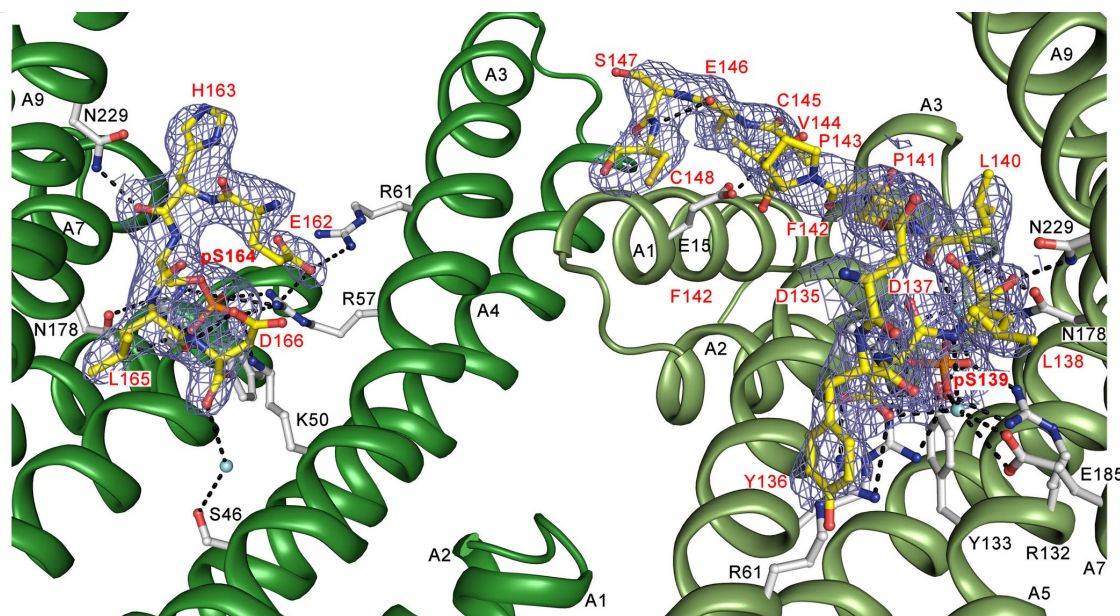
byla zaznamenána u aminokyselin Asp<sup>135</sup>-Cys<sup>148</sup> a Glu<sup>162</sup>-Asp<sup>166</sup>. Krystalová struktura ukázala fosfopeptid vázaný uvnitř centrálního kanálu 14-3-3 dimeru, se Ser<sup>139</sup> vázaným ve vazebném žlábků jednoho protomeru a se Ser<sup>164</sup> vázaným ve vazebném žlábků protomeru druhého (obr. 15).



Obr. 15: Krystalová struktura fosfopeptidu prokaspasy-2 pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup> vázaného k dimeru 14-3-3 $\gamma\Delta$ C (PDB ID: 6SAD). Přerušovaná žlutá linka na obrázku B značí sekvenci linkeru mezi Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>, která nebyla v krystalové struktuře viditelná.



V okolí fosforylačního motivu Ser<sup>164</sup> byla s dostatečnou elektronovou densitou identifikována pouze 4 aminokyselinová rezidua Glu<sup>162</sup>-Asp<sup>166</sup>, což podporuje již zjištěný fakt (fluorescenčně polarizační esej, HDX-MS, viz. výše), že toto místo je sekundární vazebné místo prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 s nižší afinitou. Okolí fosforylačního motivu Ser<sup>139</sup> je pevně vázáno polárními vazbami ve vazebném žlábků druhého protomeru. Vazbu linkeru mezi Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> bylo možné vystopovat z N-terminální části až po Cys<sup>148</sup>, lze tedy říci, že tato část linkeru je zapojená do vazby s proteinem 14-3-3 $\gamma$ . C-terminální část linkeru mezi rezidui Cys<sup>148</sup>-Glu<sup>162</sup> je neuspořádaná a patrně netvoří žádné další vazby s proteinem 14-3-3 $\gamma$  (obr. 16). Krystalizace proběhla pod dohledem prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, počítačovou analýzu krystalové struktury provedla vedoucí projektu RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.



Obr. 16: Detail vazby fosfopeptidu prokaspasy-2 pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup> ve vazebných žlábků obou protomerů 14-3-3 $\gamma\Delta$ C. Modře je naznačena elektronová hustota, kaspasová rezidua jsou červená, rezidua 14-3-3 černá. Černé přerušované čáry značí polární vazby.



*Obr. 17: Fotografie krystalů komplexu dvojitě fosforylovaného peptidu prokaspasy-2  $pS^{139}+pS^{164}$  s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta C$ . Komplex v roztoku se složením 20 mM HEPES pH 7.0, 200 mM  $MgCl_2$  a 2 mM TCEP, ve kterém byla koncentrace 14-3-3 $\gamma\Delta C$  16 mg/ml a molární poměr 14-3-3 $\gamma\Delta C$ :peptid byl 2:1.1, byl smíchán se srážecím pufrem ve složení 100 mM HEPES, 200 mM  $MgCl_2$ , 27% PEG400, 1% hexafluoro-2-propanol v poměru 1:1 a krystalován ve visících kapkách o objemu 4  $\mu$ l při 20 °C. Délka krystalů je 300 – 500  $\mu$ M.*

## 4.2. Charakterizace vazby CaMKK2 s proteinem 14-3-3 $\gamma$

**Publikace č. 4:** Psenakova, K., Petrvalska, O., Kylarova, S., Lentini Santo, D., Kalabova, D., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T., 2018. 14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK2). *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862, 1612–1625. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.006>

### 4.2.1. CaMKK2 tvoří stabilní komplex s proteinem 14-3-3 $\gamma$ , a to i v přítomnosti pouze jednoho fosforylačního místa

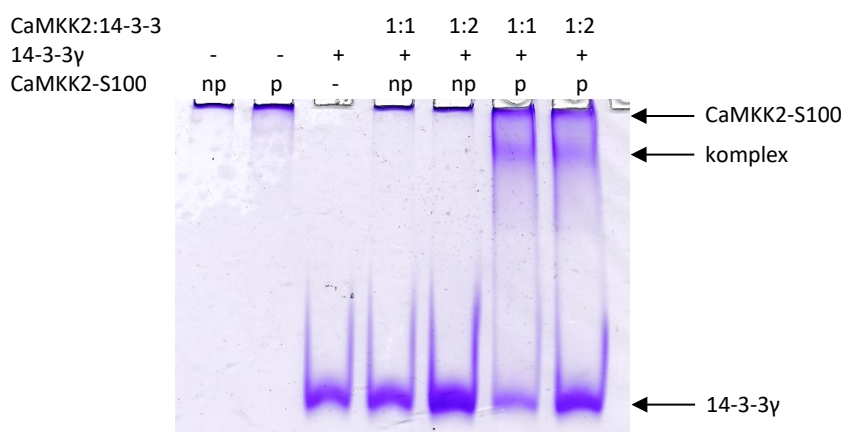
Uvažovaná vazebná místa v molekule CaMKK2 byla Ser<sup>100</sup> a Ser<sup>511</sup>. Analyzovaná část molekuly CaMKK2 byla proto zkrácena na úsek reziduí 93-517 obsahující tyto vazebné motivy, mezi nimiž se nachází kinasová doména a Ca<sup>2+</sup>/CaM vazebná doména. Pro zabránění autofosforylace byla do molekuly CaMKK2 vnesena mutace katalytického aspartátu D330A. V přípravných experimentech bylo zjištěno, že molekula CaMKK2 má čtyři fosforylační místa pro PKA - Ser<sup>100</sup>, Thr<sup>145</sup>, Ser<sup>495</sup> a Ser<sup>511</sup>. Analogicky dle molekuly CaMKK1 byla navržena vazebná místa pro protein 14-3-3, a to Ser<sup>100</sup> a Ser<sup>511</sup>. Pro přípravu jasně definovaného proteinu vhodného pro strukturní analýzu byla druhá dvě místa Thr<sup>145</sup> a Ser<sup>495</sup> mutována na alanin. Další mutagenézí S100A a S511A byly též připraveny varianty CaMKK2 pouze s jedním vazebným místem pro 14-3-3. Varianty výsledných mutantů byly označeny CaMKK2-S<sup>100</sup> (obsahující fosforylační místo Ser<sup>100</sup>), CaMKK2-S<sup>511</sup> (obsahující fosforylační místo Ser<sup>511</sup>) a CaMKK2-S<sup>100,511</sup> (obsahující obě fosforylační místa).

Fosforylace všech tří variant mutantních molekul CaMKK2 byla ověřena hmotnostní spektrometrií. Byla zjištěna pouze 50% fosforylace Ser<sup>511</sup> oproti Ser<sup>100</sup>. Formování komplexu s proteinem 14-3-3 $\gamma$  bylo ověřeno nativní TBE-PAGE. Z experimentu vyplynulo, že CaMKK2 tvoří stabilní komplex s proteinem 14-3-3 $\gamma$ , a to i v přítomnosti pouze jednoho fosforylačního místa (obr. 18).

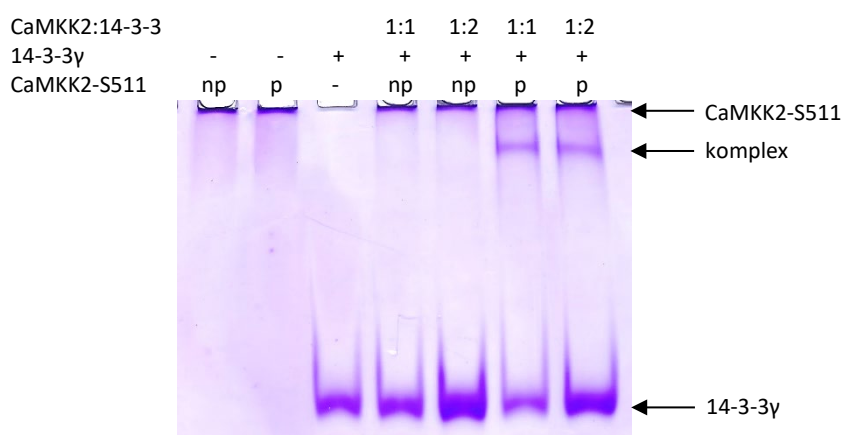
### 4.2.2. Strukturní analýza komplexu CaMKK2 s proteinem 14-3-3 $\gamma$

Strukturní analýza komplexu CaMKK2-S<sup>100,511</sup> se 14-3-3 $\gamma$  zahrnovala studii chování komplexu při analýze SV AUC. Komplex sedimentoval s hodnotou  $s_{w(20,w)}$  5.72 S, což odpovídá molekulové hmotnosti 111 kDa a stechiometrii komplexu 2:1, kdy dimer 14-3-3 váže jednu molekulu CaMKK2. Zdánlivá rovnovážná disociační konstanta byla stanovena na < 0.4  $\mu$ M.

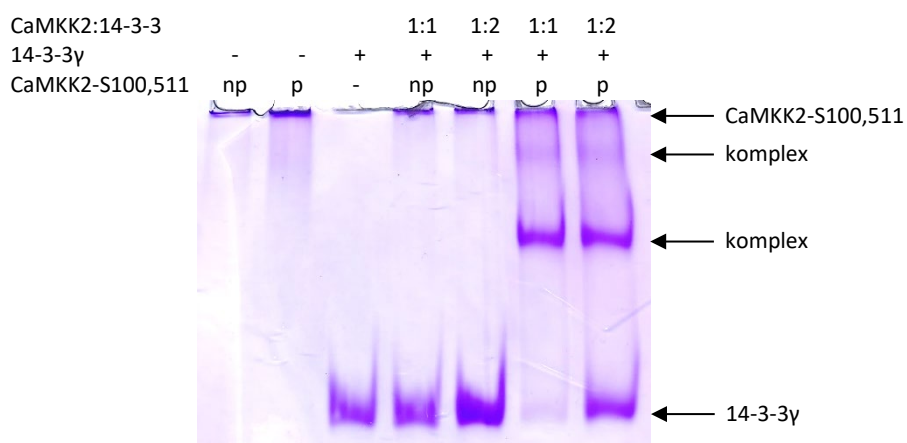
A



B



C



Obr. 18: Nativní TBE-PAGE. Interakce 14-3-3 $\gamma$  s CaMKK2 (93-517) fosforylovanou na Ser<sup>100</sup> (A), Ser<sup>511</sup> (B) nebo na obou místech Ser<sup>100</sup> a Ser<sup>511</sup> (C).

Byly provedeny funkční studie kinasové aktivity pomocí inkorporace  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP a zároveň měření časově závislé defosforylace CaMKK2 (fosforylované pomocí PKA)

enzymem PP1. Bylo zjištěno, že protein 14-3-3 svou vazbou neinhibuje aktivitu CaMKK2, ale spíše zpomaluje defosforylaci molekuly.

Strukturní studie zahrnovaly krystalizaci fosforylovaných peptidů CaMKK2, obsahujících vždy jedno z vazebných míst, Ser<sup>100</sup> či Ser<sup>511</sup>, s proteiny 14-3-3 $\gamma\Delta$ C a 14-3-3 $\zeta\Delta$ C. Dále charakterizaci komplexu fosforylovaného CaMKK2-S<sup>100</sup> s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C metodou SAXS, která potvrdila stechiometrii komplexu získanou pomocí SV-AUC a nastínila celkový tvar komplexu a umístění molekul vůči sobě. Získaná molekulová obálka měla asymetrický protáhlý tvar, přičemž většina molekuly CaMKK2 není zanořena v centrálním žlábků 14-3-3, ale je spíše připojena na boku dimeru 14-3-3. Molekula CaMKK2 interaguje s dimerem 14-3-3 $\gamma\Delta$ C jednak oblastí, kde se nachází N-terminální fosforylovaný motiv Ser<sup>100</sup>, ale také přímým kontaktem mezi kinasovou doménou CaMKK2 a povrchem 14-3-3. Celý komplex je velmi flexibilní.

Měření časově rozlišeného dohasínání intenzity fluorescence a časově rozlišeného dohasínání anizotropie fluorescence poskytlo představu o konformačních změnách během vazby molekuly CaMKK2-S<sup>100</sup> na protein 14-3-3 $\gamma$ .

Měření SV AUC, studie kinasové activity, krystalizaci komplexu 14-3-3 s fosfopeptidy CaMKK2, měření SAXS a fluorescenční měření provedla Kateřina Pšenáková a ostatní spoluautoři publikace. Mým úkolem byla příprava proteinů, příprava konstruktů CaMKK2 s kombinacemi mutací fosforylačních míst, příprava konstruktů CaMKK2 bez tryptofanu a jedno-tryptofanových mutantů, příprava neaktivních mutantů AMPKA2 a CAMK1D jako substrátů pro měření aktivity CaMKK2 a ověření tvorby komplexů pomocí TBE-PAGE.

## 5. Diskuse

Kaspasa-2 se účastní reakcí, které rozhodují o přežití buňky či o jejím zániku. Reaguje na extra i intracelulární apoptotické stimuly a spouští kaskádu dějů vedoucích k apoptose. Regulace aktivace kaspasy-2 je pro tyto pochody klíčovým bodem. Kaspasa-2 se vyskytuje v buňkách ve formě neaktivního zymogenu (prokaspasa-2) a regulace její aktivace probíhá posttranslačně, stejně jako u ostatních kaspas.

Fosforylace pomocí kinasy CaMKII popsaná u *X. laevis* na Ser<sup>135</sup> (Ser<sup>164</sup> u lidské kaspasy-2) vede k vazbě proteinu 14-3-3, který udržuje prokaspasu-2 v inhibovaném nematurovaném stavu. Defosforylací fosfatasou PP1 se prokaspasa-2 uvolní z vazby s proteinem 14-3-3, dojde k vazbě s adaptorovými proteiny a k okamžité aktivaci (Nutt et al., 2009, 2005). U lidské prokaspasy-2 existují další tři fosforylační místa zapojená do regulace její aktivity. Je to Ser<sup>157</sup>, cíl proteinkinasy CK2, jehož fosforylace oslabuje aktivaci prokaspasy-2 (Shin et al., 2005); Ser<sup>340</sup>, cíl CDK1 (z angl. cyclin-dependent kinase 1), jehož fosforylace inhibuje autolytické štěpení prokaspasy-2 během maturace a chrání tím buňky před apoptosou během mitotické části buněčného cyklu (Andersen et al., 2009), a Ser<sup>139</sup>, cíl dosud neidentifikované kinasy, jehož fosforylace může být zapojena do tumorsupresivních funkcí kaspasy-2 (Ren et al., 2012). Bioinformatické analýzy naznačily, že Ser<sup>139</sup> by mohl být u člověka spolu se Ser<sup>164</sup> vazebným místem pro regulační protein 14-3-3, což je také v souladu s výskytem dvou fosforylačních míst vzdálených od sebe přibližně 20 aminokyselin i u mnoha dalších vazebných partnerů proteinů 14-3-3 (Alblova et al., 2017; Molzan and Ottmann, 2012; Rittinger et al., 1999; Rose et al., 2012; Sluchanko et al., 2017).

Z naší studie vyplynulo, že obě fosforylační místa Ser<sup>139</sup> i Ser<sup>164</sup> se podílejí na vazbě prokaspasy-2 s proteinem 14-3-3 $\zeta$ . Navíc bylo zjištěno, že pro vytvoření komplexu mezi těmito dvěma proteiny je potřeba obou fosforylovaných serinů Ser<sup>139</sup> i Ser<sup>164</sup> (obr. 11). Rozdíl ve vazebné afinitě peptidů prokaspasy-2, které obsahovaly po jednom fosforylovaném motivu (pS<sup>139</sup> nebo pS<sup>164</sup>) nebo oba motivy najednou (pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup>) (obr. 9A), ukázal, že dominantní funkci ve vazbě prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 $\zeta$  má vazebné místo obsahující pSer<sup>139</sup>; vazebné místo obsahující pSer<sup>164</sup> je sekundární. Je však nepostradatelné pro plnou biologickou aktivitu enzymu (obr. 9B) (Yaffe, 2002).

Ze srovnání vazebné afinity prokaspasy-2 (123-452) o hodnotě  $K_D$  230  $\pm$  30 nM, s vazebnou afinitou fosfopeptidu prokaspasy-2 pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup>, která byla v mikromolárním rozpětí, vyplynulo, že na vazbě prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 $\zeta$  se podílí i ostatní části molekuly prokaspasy-2. Tato skutečnost byla popsána již dříve u komplexů 14-3-3 se

serotonin N-acetyltransferasou (AANAT) (Obsil et al., 2001), neutrální trehalasou (Nth1) (Alblova et al., 2017) a heat shock proteinem HSPB6 (Sluchanko et al., 2017).

Hypotézu, že do vazby molekuly prokaspasy-2 k proteinu 14-3-3 $\zeta$  jsou kromě vazebných fosforylovaných motivů zapojeny také ostatní části molekuly prokaspasy-2, podpořilo vytvoření strukturního modelu založeném na datech z měření SAXS a vzdálenostních omezeních 14-3-3 $\gamma$  a domény p12 získanými pomocí chemického zesílení kombinovaného s hmotnostní spektrometrií. N-terminální část prokaspasy-2 obsahující linker s vazebnými místy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> je zanořena u dna centrálního žlábků dimeru 14-3-3 $\zeta$ . Konstrukt použitý pro tuto studii postrádal N-terminální prodoménu CARD nezbytnou pro vazbu adaptorových proteinů, je-li však linker mezi CARD a p19 doménou skrytý uvnitř dimeru 14-3-3, můžeme usuzovat, že i prodoména CARD je s dimerem 14-3-3 v těsném kontaktu. Z našich měření dále vyplývá, že také většina malé katalytické podjednotky p12 prokaspasy-2 je uvnitř centrálního žlábků 14-3-3 $\zeta$  a její helix  $\alpha 7$  interaguje s kličkou mezi helixy H3 a H4 proteinu 14-3-3 $\zeta$ . Pozice domén p12 a p19 prokaspasy-2 jsou stabilizovány interakcí s helixy H9 obou protomerů 14-3-3 $\zeta$  (obr. 12). Tyto výsledky byly potvrzeny i měřeními H/D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií, kdy po vytvoření komplexu prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 $\gamma$  klesla míra izotopové výměny jak v oblasti vazebného místa Ser<sup>139</sup> (úsek aminokyselin 135-146), tak také v místě C-terminálního helixu  $\alpha 7$  v doméně p12 (408-413), což svědčí o protekci těchto úseků prokaspasy-2 (dp) proteinem 14-3-3 $\gamma$  (obr. 14).

Proenzym kaspasy-2 je aktivován vazbou na vysokomolekulární komplex složený z adaptorových proteinů, ve kterém získají molekuly prokaspasy-2 vhodnou prostorovou orientaci pro následnou autoproteolýzu (Park et al., 2007). Je odštěpena prodoména CARD a linkery mezi doménami a vzniká maturovaná aktivní kaspasa-2 jako heterodimer složený ze dvou p19 a dvou p12 katalytických podjednotek. Bylo prokázáno, že dimerizace prokaspasy-2 vyžaduje jak doménu CARD, tak aminokyselinová rezidua z C-koncové domény p12 (Butt et al., 1998; Schweizer et al., 2003; Tang et al., 2011). Naše data ukázala, že oba regiony potřebné pro dimerizaci prokaspasy-2 jsou v těsném kontaktu s molekulou dimeru 14-3-3, a proto způsob, kterým 14-3-3 inhibuje aktivaci prokaspasy-2, může být cestou zabránění oligomerizace prokaspasy-2 a/nebo její vazby na adaptorové proteiny.

Kaspasa-2 se jako jediná s kaspas vyskytuje nejenom v cytoplazmě buňky, ale také v jádře. V závislosti na druhu podnětu má dva oddělené aktivační profily. Zásahy do buňky poškozující DNA vyvolávají aktivaci prokaspasy-2 v jádře, zatímco aktivace v cytoplasmě je odezvou na jiné stresové podněty (Ando et al., 2017). Lokalizace prokaspasy-2 je řízena

jadernou lokalizační sekvencí, která je umístěna přesně mezi oběma 14-3-3 vazebnými motivy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> v linkru mezi prodoménou CARD a velkou podjednotkou p19 katalytické domény prokaspasy-2 (Baliga et al., 2003; Mancini et al., 2000; O'Reilly et al., 2002). Krystalická struktura dvojité fosforylovaného peptidu prokaspasy-2 pS<sup>139</sup>+pS<sup>164</sup> v rozsahu aminokyselin 135-168 potvrdila, že k interakci mezi proteinem 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C a prokaspasou-2 jsou nutné oba fosforylované vazebné motivy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>, a také nalezla další interakce mezi linkerem spojujícím tyto dva motivy a 14-3-3 $\gamma$  $\Delta$ C (obr. 16). Jelikož je tato oblast prokaspasy-2 zanořena do centrálního žlábků dimeru 14-3-3, můžeme usuzovat, že protein 14-3-3 při vazbě na prokaspasu-2 kryje její NLS a může tak inhibovat aktivaci kaspasy-2 prostřednictvím její lokalizace.

Strukturní analýza dále potvrdila, že Ser<sup>139</sup> je dominantním vazebným místem, které je se svým okolím pevně vázáno polárními vazbami ve vazebném žlábků jednoho protomeru 14-3-3, kdežto Ser<sup>164</sup> leží v neuspořádané C-terminální části linkeru prokaspasy-2 s nižší afinitou k povrchu protomeru druhého. Pro formování komplexu jsou však nutná obě tato fosforylovaná místa. Fosforylace Ser<sup>139</sup> vyvolá interakci s regulačním proteinem 14-3-3, která je doplněna a stabilizována interakcí s druhým sekundárním fosforylovaným motivem Ser<sup>164</sup> s nižší afinitou (Yaffe, 2002).

Dalším vazebným partnerem proteinů 14-3-3, u kterého byla provedena charakterizace interakce, je kinasa CaMKK2. Mezi čtyřmi kandidátními fosforylačními vazebnými místy byla potvrzena dvě místa, a to Ser<sup>100</sup> a Ser<sup>511</sup>, která se účastní vazby s proteinem 14-3-3 $\gamma$ . Podobně jako u prokaspasy-2, i zde byl poměr molekul v komplexu 1:2, tedy jedna molekula CaMKK2 se váže k dimeru 14-3-3 $\gamma$ . Metodou nativní elektroforesy v TBE pufru bylo zjištěno, že k vytvoření komplexu stačí pouze jedno fosforylované vazebné místo. Strukturní analýza komplexu však ukázala, že zatímco komplex 14-3-3 $\gamma$  s CaMKK2-S<sup>100</sup> je velmi flexibilní a má asymetrický protáhlý tvar, přítomnost druhého fosforylovaného vazebného místa Ser<sup>511</sup> zvýšila celkovou stabilitu komplexu a snížila konformační flexibilitu. Další měření přinesla zjištění, že protein 14-3-3 neinhubuje aktivitu kinasy CaMKK2, podobně jako je tomu u strukturně podobné CaMKK1 (Davare et al., 2004; Ichimura et al., 2008), ale spíše zpomaluje její defosforylaci. To naznačuje, že isoformy CaMKK se liší v regulaci zprostředkované 14-3-3, patrně kvůli rozdílům v jejich biochemických vlastnostech (Anderson et al., 1998; Tokumitsu et al., 2000).



## 6. Závěr

Cílem disertační práce bylo popsat mechanismus inhibice lidské kaspasy-2 prostřednictvím regulačních proteinů 14-3-3. Proteiny 14-3-3 interagují se svými ligandy prostřednictvím fosforylovaných vazebných motivů. Mechanismus regulace aktivity různých ligandů se liší. Svou vazbou mohou například přímo změnit konformaci vazebného partnera, mohou maskovat jeho vazebný povrch anebo vazbou dvou ligandů mohou zprostředkovat nové interakce. Jedním z vazebných partnerů je kaspasa-2, enzym působící v kaskádě dějů vedoucích k apoptose. Inhibice aktivace kaspasy-2 proteinem 14-3-3 byla popsána v souvislosti s energetickou bilancí buňky u oocytů *X. laevis* a později také u myši (Nutt et al., 2009, 2005), nebyla však popsána molekulární podstata této regulace.

Základním předpokladem bylo vypracování protokolu na expresi a purifikaci stabilní a solubilní formy enzymu kaspasy-2 v dostatečném množství a čistotě.

Z dosavadních poznatků a bioinformační analýzou byla predikována dvě možná vazebná místa v molekule prokaspasy-2, a to Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>. Byla vytvořena neaktivní varianta prokaspasy-2, která nepodléhala proteolytickému štěpení a obsahovala linker s vazebnými místy pro protein 14-3-3, který se jinak při maturaci enzymu odštěpuje. Byla vytvořena varianta neaktivní prokaspasy-2, kde byla predikovaná místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> upravena tak, aby mohla být fosforylována PKA.

Metodami AUC a nativní elektroforézy v TBE pufru bylo potvrzeno, že prokaspasa-2 fosforylovaná na obou serinech Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> tvoří stabilní komplex s proteinem 14-3-3 $\zeta$ . Navíc bylo zjištěno, že tento komplex se tvoří pouze tehdy, jsou-li obě tato místa fosforylovaná.

Fluorescenčně polarizační esej, která sledovala vazbu prokaspasových fosfopeptidů k 14-3-3 $\zeta$ , odhalila, že vazebná afinita fosfopeptidů obsahujících vždy jeden Ser<sup>139</sup> nebo Ser<sup>164</sup> není stejná. Ser<sup>139</sup> s vysokou vazebnou afinitou se jeví jako primární místo vazby, kterou doplňuje sekundární vazba Ser<sup>164</sup>, která je nízkoafinitní, avšak nutná pro úplnou biologickou aktivitu.

Metodou AUC byl určen stechiometrický poměr v komplexu prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 $\zeta$ , a to 1:2, kdy jedna molekula prokaspasy-2 (dp) se váže k dimeru 14-3-3 $\zeta$ . Byla stanovena hodnota zdánlivé disociační konstanty proteinového komplexu  $K_D$  230  $\pm$  30 nM.

Strukturním modelováním založeném na výsledcích ze SAXS a chemického zesílení byl vytvořen model komplexu, který ukázal jeho kompaktní tvar, ve kterém je molekula prokaspasy-2 (dp) svým linkerem s vazebnými místy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> a také C-terminální částí

podjednotky p12 zanořena do centrálního žlábků dimeru 14-3-3 $\zeta$  a celá molekula prokaspasy-2 (dp) je stabilizována interakcí s helixy H9 obou protomerů proteinu 14-3-3 $\zeta$ . Z modelu vyplynulo, že na interakci mezi proteiny se podílí kromě vazebných míst Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> i ostatní části obou molekul. S tímto zjištěním jsou v souladu i výsledky měření HDX-MS, které odhalily místa kontaktu molekuly prokaspasy-2 (dp) se 14-3-3 $\gamma$ . Také rozdíl ve vazebné afinitě fosfopeptidů prokaspasy-2 s disociační konstantou v mikromolárním rozpětí a afinitě molekuly prokaspasy-2 (dp) (123-452) s disociační konstantou v rozpětí nanomolárním potvrzuje podíl dalších částí molekul na vzájemné vazbě.

Neboť protein 14-3-3 svou vazbou prostorově obklopuje malou katalytickou podjednotku p12 prokaspasy-2, která se účastní její oligomerizace, usuzujeme, že mechanismus inhibice aktivace prokaspasy-2 proteinem 14-3-3 může být v blokování její oligomerizace během maturace a/nebo blokování její vazby na adaptorové proteiny.

Krystalizace fosfopeptidu prokaspasy-2 obsahujícím obě vazebná místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup> v rozpětí aminokyselin 135-168 s proteinem 14-3-3 $\gamma\Delta C$  dala představu o detailním postavení aminokyselin ve vazebném místě. Krystalová struktura komplexu ukázala, že protein 14-3-3 svou vazbou též obklopuje jadernou lokalizační sekvenci, která se nachází v molekule prokaspasy-2 na spojnici mezi vazebnými motivy Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>. Proto dalším možným mechanismem vlivu proteinu 14-3-3 na její aktivaci může být blokování její translokace z cytoplasmy do jádra a následné aktivace v jádru buňky, ke které dochází v případech poškození dvoušroubovicové DNA.

V projektu charakterizace vazby proteinu 14-3-3 ke kinase CaMKK2 bylo očekáváno pozorování inhibice aktivity kinasy, podobně jako je tomu u jejího isomeru CaMKK1. Tento jev nebyl potvrzen, pozorováno bylo spíše zpomalení defosforylace CaMKK2 po vazbě na protein 14-3-3. Byla identifikována dvě vazebná místa v molekule CaMKK2, a to Ser<sup>100</sup> a Ser<sup>511</sup>. Metoda TBE-PAGE odhalila, že k vytvoření komplexu mezi molekulami stačí pouze jedno fosforylované místo, nicméně strukturní analýzy komplexů 14-3-3 $\gamma$  s molekulami CaMKK2-S<sup>100</sup> a CaMKK2-S<sup>100,511</sup> ukázaly, že vazba obou fosforylovaných míst najednou přispěje k celkové stabilitě komplexu a snížení jeho konformační flexibility.

## 7. Souhrn

Kaspasa-2 je jedním z enzymů v kaskádě dějů vedoucích k apoptose. Má významnou úlohu v rozhodování o osudu buňky, a proto je regulace jejího zapojení do apoptotických dějů velmi významná. Náplní této disertační práce bylo objasnění jednoho ze způsobů regulace aktivity lidské kaspasy-2, a to prostřednictvím její posttranslační modifikace fosforylace a následné vazby regulačního proteinu 14-3-3. Proteiny 14-3-3 jsou rodina konzervovaných multifunkčních regulačních bílkovin, které specificky interagují s fosforylovanými ligandy prostřednictvím přesně definovaných vazebných motivů. V této studii bylo potvrzeno, že protein 14-3-3 se váže na dvě fosforylační místa v molekule prokaspasy-2 umístěná v linkeru mezi N-terminální prodoménou CARD a velkou katalytickou podjednotkou p19. Komplex tvoří jedna molekula prokaspasy-2 vázaná na dimer 14-3-3, se silnou vazebnou afinitou o hodnotě zdánlivé disociační konstanty v nanomolárním rozpětí. Komplex má kompaktní tvar, ve kterém je molekula prokaspasy-2 částečně zanořena do centrálního žlábků dimeru a stabilizována C-terminálními helixy obou protomerů proteinu 14-3-3. Na dně centrálního kanálu dimeru je vázaná část molekuly prokaspasy-2 obsahující fosforylovaná vazebná místa Ser<sup>139</sup> a Ser<sup>164</sup>, jadernou lokalizační sekvenci a také malou katalytickou podjednotku p12. Vzhledem k těmto místům interakce lze usuzovat, že jedním ze způsobů regulace prokaspasy-2 proteinem 14-3-3 je inhibice její oligomerizace a/nebo vazby na adaptorové proteiny. Druhým možným způsobem je regulace aktivace prostřednictvím lokalizace v buňce.

Následkem poškozené apoptotické odpovědi jsou četné buněčné poruchy jako genomová nestabilita, poškození buněčného cyklu, poškození odpovědi na oxidační stress a předčasné stárnutí buňky (Dorstyn et al., 2012; Shalini et al., 2012). Takové poruchy na druhou stranu činí buňku více susceptibilní pro chemoterapeutika (Ando et al., 2017). Tato skutečnost otevírá nové terapeutické možnosti a potvrzuje důležitost studia aktivace a aktivity kaspasy-2.

CaMKK2 je člen rodiny kalcium/kalmodulin dependentních kinas podílejících se na celé řadě pochodů v organismu jako je regulace adipozity, homeostasy glukosy, hematopoesy nebo rakovina. Samotný gen CaMKK2 má nejsilnější expresi v mozku a ovlivňuje signální kaskády související s učením a pamětí, diferenciací a migrací neuronů, růstem neuritů a tvorbou synapsí (Hatsuda et al., 2023; Lee et al., 2022; Najar et al., 2021). Porozuměním mechanismu regulace aktivity této kinas prostřednictvím proteinu 14-3-3 se výzkum může přiblížit k vysvětlení příčin poruch s kinasou spojených.

## 8. Summary

Caspase-2 acts as one of the enzymes in the cascade of reactions leading to apoptosis. It plays an important role in cell fate decision and therefore regulation of its involvement in apoptosis is very important. The aim of this thesis was to elucidate one of the ways of regulation of human caspase-2 activity, namely its post-translational modification by phosphorylation and subsequent binding of the scaffolding protein 14-3-3. The 14-3-3 proteins are a family of conserved multifunctional regulatory proteins that specifically interact with phosphorylated ligands via well-defined binding motifs. In this study, it was confirmed that the 14-3-3 protein binds to two phosphorylation sites in the procaspase-2 molecule located within the linker between the N-terminal CARD prodomain and the large catalytic subunit p19. The complex consists of a single procaspase-2 molecule bound to the 14-3-3 dimer, with a strong binding affinity. The complex has a compact shape in which the procaspase-2 molecule is partially embedded in the central groove of the dimer and stabilized by interactions with the C-terminal helices of both 14-3-3 protomers. Sterically occluded within the central groove of the dimer is a sequence of the procaspase-2 molecule containing phosphorylated Ser<sup>139</sup> and Ser<sup>164</sup> binding sites, a nuclear localization sequence, as well as a small catalytic subunit, p12. Given these interaction sites, it can be inferred that a possible way of inhibition of procaspase-2 by 14-3-3 protein is through preventing its oligomerization and/or binding to adaptor proteins. The second possible mode of inhibition is through cellular localization.

The impaired apoptotic response results in numerous cellular defects such as genomic instability, cell cycle impairment, incorrect response to oxidative stress, and premature cell aging (Dorstyn et al., 2012; Shalini et al., 2012). Such disturbances, in turn, make the cell more susceptible to chemotherapeutic agents (Ando et al., 2017). This fact opens new therapeutic possibilities and confirms the importance of caspase-2 activation and activity study.

CaMKK2 is a member of a family of calcium/calmodulin-dependent kinases involved in a variety of processes in the body. The CaMKK2 gene itself has the strongest expression in the brain and influences signalling cascades related to learning and memory, neuronal differentiation and migration, neurite outgrowth, and synapse formation (Hatsuda et al., 2023; Lee et al., 2022; Najar et al., 2021). By understanding the mechanism of regulation of this kinase activity by the 14-3-3 protein, research may move closer to explaining the causes of kinase-related disorders.

## 9. Literatura

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W., 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9, 423–432. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00442-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00442-2)
- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>
- Alblova, M., Smidova, A., Docekal, V., Vesely, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T., 2017. Molecular basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E9811–E9820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714491114>
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81334-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81334-3)
- Andersen, J.L., Johnson, C.E., Freel, C.D., Parrish, A.B., Day, J.L., Buchakjian, M.R., Nutt, L.K., Thompson, J.W., Moseley, M.A., Kornbluth, S., 2009. Restraint of apoptosis during mitosis through interdomain phosphorylation of caspase-2. *EMBO J.* 28, 3216–3227. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.253>
- Anderson, K.A., Means, R.L., Huang, Q.H., Kemp, B.E., Goldstein, E.G., Selbert, M.A., Edelman, A.M., Freneau, R.T., Means, A.R., 1998. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase beta. *J. Biol. Chem.* 273, 31880–31889. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.31880>
- Ando, K., Parsons, M.J., Shah, R.B., Charendoff, C.I., Paris, S.L., Liu, P.H., Fassio, S.R., Rohrman, B.A., Thompson, R., Oberst, A., Sidi, S., Bouchier-Hayes, L., 2017. NPM1 directs PIDDosome-dependent caspase-2 activation in the nucleolus. *J. Cell Biol.* 216, 1795–1810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608095>
- Baliga, B.C., Colussi, P.A., Read, S.H., Dias, M.M., Jans, D.A., Kumar, S., 2003. Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. *J. Biol. Chem.* 278, 4899–4905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211512200>
- Baliga, B.C., Read, S.H., Kumar, S., 2004. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* 11, 1234–1241. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401492>
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A.M., Prives, C., 2008. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1937–1942. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711800105>
- Berg, D., Holzmann, C., Riess, O., 2003. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 752–762. <https://doi.org/10.1038/nrn1197>
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., Salvesen, G.S., 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11, 529–541. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00051-0)
- Boatright, K.M., Salvesen, G.S., 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 725–731. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.009>

- Boston, P.F., Jackson, P., Kynoch, P.A., Thompson, R.J., 1982. Purification, properties, and immunohistochemical localisation of human brain 14-3-3 protein. *J. Neurochem.* 38, 1466–1474. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb07927.x>
- Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G.P., Connell, S., Tait, S.W.G., Dillon, C.P., Flanagan, J.M., Beere, H.M., Green, D.R., 2009. Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. *Mol. Cell* 35, 830–840. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.023>
- Braga, M., Sinha Hikim, A.P., Datta, S., Ferrini, M.G., Brown, D., Kovacheva, E.L., Gonzalez-Cadavid, N.F., Sinha-Hikim, I., 2008. Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 822–832. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0216-7>
- Brown, P.H., Balbo, A., Schuck, P., 2008. Characterizing protein-protein interactions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 18, 18.15.1-18.15.39. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1815s81>
- Buchakjian, M.R., Kornbluth, S., 2010. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 715–727. <https://doi.org/10.1038/nrm2972>
- Butt, A.J., Harvey, N.L., Parasivam, G., Kumar, S., 1998. Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 273, 6763–6768. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6763>
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97–100. <https://doi.org/10.1126/science.1373520>
- Connolly, P., Garcia-Carpio, I., Villunger, A., 2020. Cell-Cycle Cross Talk with Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12, a036475. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036475>
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7)
- Davare, M.A., Saneyoshi, T., Guire, E.S., Nygaard, S.C., Soderling, T.R., 2004. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3. *J. Biol. Chem.* 279, 52191–52199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409873200>
- Dorstyn, L., Puccini, J., Wilson, C.H., Shalini, S., Nicola, M., Moore, S., Kumar, S., 2012. Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ.* 19, 1288–1298. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.36>
- Duan, H., Dixit, V.M., 1997. RAIDD is a new “death” adaptor molecule. *Nature* 385, 86–89. <https://doi.org/10.1038/385086a0>
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.383>
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., Tschachler, E., 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 25, 831–841. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn012>
- Estrov, Z., Thall, P.F., Talpaz, M., Estey, E.H., Kantarjian, H.M., Andreeff, M., Harris, D., Van, Q., Walterscheid, M., Kornblau, S.M., 1998. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 92, 3090–3097.

- Fantl, W.J., Muslin, A.J., Kikuchi, A., Martin, J.A., MacNicol, A.M., Gross, R.W., Williams, L.T., 1994. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 371, 612–614. <https://doi.org/10.1038/371612a0>
- Feinstein-Rotkopf, Y., Arama, E., 2009. Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 14, 980–995. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0346-6>
- Gu, H., Chen, X., Gao, G., Dong, H., 2008. Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2298–2307. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0186>
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 13430–13437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108029200>
- Hashiguchi, M., Sobue, K., Paudel, H.K., 2000. 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 25247–25254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003738200>
- Hatsuda, A., Kurisu, J., Fujishima, K., Kawaguchi, A., Ohno, N., Kengaku, M., 2023. Calcium signals tune AMPK activity and mitochondrial homeostasis in dendrites of developing neurons. *Dev. Camb. Engl. dev.*201930. <https://doi.org/10.1242/dev.201930>
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M., 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296–299. <https://doi.org/10.1038/387296a0>
- Hermeking, H., Benzinger, A., 2006. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer Biol.* 16, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.002>
- Ho, L.H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P., Kumar, S., 2009. A tumor suppressor function for caspase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5336–5341. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811928106>
- Hofmann, W.K., de Vos, S., Tsukasaki, K., Wachsmann, W., Pinkus, G.S., Said, J.W., Koeffler, H.P., 2001. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 98, 787–794. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.3.787>
- Holleman, A., den Boer, M.L., Kazemier, K.M., Beverloo, H.B., von Bergh, A.R.M., Janka-Schaub, G.E., Pieters, R., 2005. Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106, 1817–1823. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4296>
- Honda, H., Nagamachi, A., Inaba, T., 2015. -7/7q- syndrome in myeloid-lineage hematopoietic malignancies: attempts to understand this complex disease entity. *Oncogene* 34, 2413–2425. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.196>
- Ichimura, T., Taoka, M., Hozumi, Y., Goto, K., Tokumitsu, H., 2008. 14-3-3 Proteins directly regulate Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha through phosphorylation-dependent multisite binding. *FEBS Lett.* 582, 661–665. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.037>
- Ito, A., Uehara, T., Tokumitsu, A., Okuma, Y., Nomura, Y., 1999. Possible involvement of cytochrome c release and sequential activation of caspases in ceramide-induced apoptosis in SK-N-MC cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1452, 263–274. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(99\)00131-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(99)00131-7)
- Itoh, N., Nagata, S., 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268, 10932–10937.
- Jang, T., Park, H.H., 2013. PIDD mediates and stabilizes the interaction between RAIDD and caspase-2 for the PIDDosome assembly. *BMB Rep.* 46, 471–476. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2013.46.9.021>

- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.  
<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.  
<https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kim, Min S., Chung, N.G., Yoo, N.J., Lee, S.H., 2011. Somatic mutation of proapoptotic caspase-2 gene is rare in acute leukemias and common solid cancers. *Eur. J. Haematol.* 86, 449–450. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01591.x>
- Kim, Min Sung, Kim, H.S., Jeong, E.G., Soung, Y.H., Yoo, N.J., Lee, S.H., 2011. Somatic mutations of caspase-2 gene in gastric and colorectal cancers. *Pathol. Res. Pract.* 207, 640–644. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.08.004>
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x>
- Konermann, L., Pan, J., Liu, Y.-H., 2011. Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. *Chem. Soc. Rev.* 40, 1224–1234.  
<https://doi.org/10.1039/c0cs00113a>
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., Schlesinger, P.H., 2000. Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1166–1173.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400783>
- Kostecky, B., Saurin, A.T., Purkiss, A., Parker, P.J., McDonald, N.Q., 2009. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO Rep.* 10, 983–989. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.150>
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., Vousden, K.H., 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299–303. <https://doi.org/10.1038/387299a0>
- Kukimoto-Niino, M., Yoshikawa, S., Takagi, T., Ohsawa, N., Tomabechi, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Suzuki, A., Lee, S., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Kadowaki, T., Minokoshi, Y., Yokoyama, S., 2011. Crystal structure of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in complex with the inhibitor STO-609. *J. Biol. Chem.* 286, 22570–22579.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251710>
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1994. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev.* 8, 1613–1626.  
<https://doi.org/10.1101/gad.8.14.1613>
- Kumar, S., White, D.L., Takai, S., Turczynowicz, S., Juttner, C.A., Hughes, T.P., 1995. Apoptosis regulatory gene NEDD2 maps to human chromosome segment 7q34-35, a region frequently affected in haematological neoplasms. *Hum. Genet.* 95, 641–644. <https://doi.org/10.1007/BF00209480>
- Kuranaga, E., Miura, M., 2007. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* 17, 135–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.01.001>
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., Lazebnik, Y., 2002. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352–1354.  
<https://doi.org/10.1126/science.1074721>
- Lee, A., Kondapalli, C., Virga, D.M., Lewis, T.L., Koo, S.Y., Ashok, A., Mairret-Coello, G., Herzig, S., Foretz, M., Viollet, B., Shaw, R., Sproul, A., Polleux, F., 2022. Aβ42 oligomers trigger synaptic loss through CAMKK2-AMPK-dependent



- effectors coordinating mitochondrial fission and mitophagy. *Nat. Commun.* 13, 4444. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32130-5>
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81590-1)
- Li, J., Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194–6206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H., Liddington, R., 1995. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376, 191–194. <https://doi.org/10.1038/376191a0>
- Liu, P., Smith, B.R., Huang, E.S., Mahesh, A., Vonsattel, J.P.G., Petersen, A.J., Gomez-Pastor, R., Ashe, K.H., 2019. A soluble truncated tau species related to cognitive dysfunction and caspase-2 is elevated in the brain of Huntington’s disease patients. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 111. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0764-9>
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9)
- López-García, C., Sansregret, L., Domingo, E., McGranahan, N., Hobor, S., Birkbak, N.J., Horswell, S., Grönroos, E., Favero, F., Rowan, A.J., Matthews, N., Begum, S., Phillimore, B., Burrell, R., Oukrif, D., Spencer-Dene, B., Kovac, M., Stamp, G., Stewart, A., Danielsen, H., Novelli, M., Tomlinson, I., Swanton, C., 2017. BCL9L Dysfunction Impairs Caspase-2 Expression Permitting Aneuploidy Tolerance in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* 31, 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.001>
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81589-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81589-5)
- Madden, S.D., Cotter, T.G., 2008. Cell death in brain development and degeneration: control of caspase expression may be key! *Mol. Neurobiol.* 37, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8021-4>
- Malladi, S., Challa-Malladi, M., Fearnhead, H.O., Bratton, S.B., 2009. The Apaf-1\*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J.* 28, 1916–1925. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.152>
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., Rosen, A., 2000. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 149, 603–612. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.3.603>
- Marcelo, K.L., Means, A.R., York, B., 2016. The Ca(2+)/Calmodulin/CaMKK2 Axis: Nature’s Metabolic CaMshaft. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 27, 706–718. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.06.001>
- McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W., 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- McPherson, A., 1999. *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Molzan, M., Ottmann, C., 2012. Synergistic binding of the phosphorylated S233- and S259-binding sites of C-RAF to one 14-3-3 $\zeta$  dimer. *J. Mol. Biol.* 423, 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.009>

- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J., 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237–1245. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90644-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-r)
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S., 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889–897. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81067-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81067-3)
- Najar, M.A., Rex, D. a. B., Modi, P.K., Agarwal, N., Dagamajalu, S., Karthikkeyan, G., Vijayakumar, M., Chatterjee, A., Sankar, U., Prasad, T.S.K., 2021. A complete map of the Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2) signaling pathway. *J. Cell Commun. Signal.* 15, 283–290. <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00592-1>
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37–43. <https://doi.org/10.1038/376037a0>
- Nutt, L.K., Buchakjian, M.R., Gan, E., Darbandi, R., Yoon, S.-Y., Wu, J.Q., Miyamoto, Y.J., Gibbons, J.A., Andersen, J.L., Freel, C.D., Tang, W., He, C., Kurokawa, M., Wang, Y., Margolis, S.S., Fissore, R.A., Kornbluth, S., 2009. Metabolic control of oocyte apoptosis mediated by 14-3-3zeta-regulated dephosphorylation of caspase-2. *Dev. Cell* 16, 856–866. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.005>
- Nutt, L.K., Margolis, S.S., Jensen, M., Herman, C.E., Dunphy, W.G., Rathmell, J.C., Kornbluth, S., 2005. Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell* 123, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.032>
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., Dyda, F., 2001. Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105, 257–267. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00316-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00316-6)
- Obsil, T., Obsilova, V., 2011. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 663–672. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.001>
- Obsilova, V., Obsil, T., 2020. The 14-3-3 Proteins as Important Allosteric Regulators of Protein Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8824. <https://doi.org/10.3390/ijms21228824>
- Oliver, T.G., Meylan, E., Chang, G.P., Xue, W., Burke, J.R., Humpton, T.J., Hubbard, D., Bhutkar, A., Jacks, T., 2011. Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Mol. Cell* 43, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.012>
- O'Reilly, L.A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D.L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D.C.S., Kumar, S., 2002. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ.* 9, 832–841. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401033>
- Park, H.H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschopp, J., Wu, H., 2007. Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell* 128, 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.019>
- Parrish, A.B., Freel, C.D., Kornbluth, S., 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008672. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008672>
- Pasterkamp, R.J., Peschon, J.J., Spriggs, M.K., Kolodkin, A.L., 2003. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424, 398–405. <https://doi.org/10.1038/nature01790>

- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991201\)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2)
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., Salvesen, G.S., 2006. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol. Cell* 22, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.009>
- Ren, K., Lu, J., Porollo, A., Du, C., 2012. Tumor-suppressing function of caspase-2 requires catalytic site Cys-320 and site Ser-139 in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 14792–14802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.347625>
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 405–413. <https://doi.org/10.1038/nrm2153>
- Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 897–907. <https://doi.org/10.1038/nrm1496>
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B., 1999. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol. Cell* 4, 153–166. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80363-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80363-9)
- Roschitzki-Voser, H., Schroeder, T., Lenherr, E.D., Frölich, F., Schweizer, A., Donepudi, M., Ganesan, R., Mittl, P.R.E., Baici, A., Grütter, M.G., 2012. Human caspases in vitro: expression, purification and kinetic characterization. *Protein Expr. Purif.* 84, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.05.009>
- Rose, R., Rose, M., Ottmann, C., 2012. Identification and structural characterization of two 14-3-3 binding sites in the human peptidylarginine deiminase type VI. *J. Struct. Biol.* 180, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.05.010>
- Rupp, B., 2009. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Garland Science, New York. <https://doi.org/10.1201/9780429258756>
- Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., Sica, F., 2013. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11643–11691. <https://doi.org/10.3390/ijms140611643>
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1675>
- Schuck, P., 2003. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.* 320, 104–124. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00289-6](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00289-6)
- Schuck, P., 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76713-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76713-0)
- Schweizer, A., Briand, C., Grutter, M.G., 2003. Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 42441–42447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304895200>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Wilson, C., Puccini, J., Ho, L., Kumar, S., 2012. Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice. *Cell Death Differ.* 19, 1370–1380. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.13>
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., Kim, K., 2005. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.* 24, 3532–3542. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600827>
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J., 1999.

- Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281–292. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.281>
- Sluchanko, N.N., Beelen, S., Kulikova, A.A., Weeks, S.D., Antson, A.A., Gusev, N.B., Strelkov, S.V., 2017. Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator. *Struct. Lond. Engl.* 1993 25, 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.005>
- Smith, B.R., Nelson, K.M., Kemper, L.J., Leinonen-Wright, K., Petersen, A., Keene, C.D., Ashe, K.H., 2019. A soluble tau fragment generated by caspase-2 is associated with dementia in Lewy body disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 124. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0765-8>
- Sparta, K.M., Krug, M., Heinemann, U., Mueller, U., Weiss, M.S., 2016. XDSAPP2.0. *J. Appl. Crystallogr.* 49, 1085–1092. <https://doi.org/10.1107/S1600576716004416>
- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41, 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Tang, Y., Wells, J.A., Arkin, M.R., 2011. Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis. *J. Biol. Chem.* 286, 34147–34154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.247627>
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>
- Tinel, A., Tschopp, J., 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843–846. <https://doi.org/10.1126/science.1095432>
- Tinnikov, A.A., Samuels, H.H., 2013. A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli. *PLoS One* 8, e61085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061085>
- Tinti, M., Johnson, C., Toth, R., Ferrier, D.E.K., Mackintosh, C., 2012. Evolution of signal multiplexing by 14-3-3-binding 2R-ohnologue protein families in the vertebrates. *Open Biol.* 2, 120103. <https://doi.org/10.1098/rsob.120103>
- Tokumitsu, H., Iwabu, M., Ishikawa, Y., Kobayashi, R., 2001. Differential regulatory mechanism of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms. *Biochemistry* 40, 13925–13932. <https://doi.org/10.1021/bi010863k>
- Tokumitsu, H., Muramatsu, M. a, Ikura, M., Kobayashi, R., 2000. Regulatory mechanism of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 20090–20095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002193200>
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K.M., Krammer, P.H., 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301–305. <https://doi.org/10.1126/science.2787530>
- Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L., Balan, V., 2006. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin. Cancer Biol.* 16, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.004>
- Vagin, A., Teplyakov, A., 1997. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022–1025. <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>
- Valeur, B., Berberan-Santos, M.N., 2012. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1st ed. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527650002>

- Van Der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M., Smidt, M.P., 2004. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* 380, 297–309. <https://doi.org/10.1042/BJ20040167>
- Van Der Hoeven, P.C., Van Der Wal, J.C., Ruurs, P., Van Blitterswijk, W.J., 2000. Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3. *Biochem. J.* 347 Pt 3, 781–785. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470781>
- Wachmann, K., Pop, C., van Raam, B.J., Drag, M., Mace, P.D., Snipas, S.J., Zmasek, C., Schwarzenbacher, R., Salvesen, G.S., Riedl, S.J., 2010. Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry* 49, 8307–8315. <https://doi.org/10.1021/bi100968m>
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., Yuan, J., 1994. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78, 739–750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(94\)90422-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(94)90422-7)
- Wang, Y., Liu, C., Wang, J., Zhang, Y., Chen, L., 2017. Iodine-131 induces apoptosis in human cardiac muscle cells through the p53/Bax/caspase-3 and PIDD/caspase-2/t-BID/cytochrome c/caspase-3 signaling pathway. *Oncol. Rep.* 38, 1579–1586. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5813>
- Yaffe, M.B., 2002. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 513, 53–57. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03288-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03288-4)
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gambelin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C., 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961–971. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80487-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80487-0)
- Yamada, K., Yoshida, K., 2019. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1866, 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.009>
- Yang, H., Masters, S.C., Wang, H., Fu, H., 2001. The proapoptotic protein Bad binds the amphipathic groove of 14-3-3zeta. *Biochim. Biophys. Acta* 1547, 313–319. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(01\)00202-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(01)00202-3)
- Yang, X., Lee, W.H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C.V., Grossmann, J.G., Sundström, M., Doyle, D.A., Elkins, J.M., 2006. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17237–17242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605779103>
- Yi, C.H., Yuan, J., 2009. The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Dev. Cell* 16, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.012>
- Zhao, X., Kotilinek, L.A., Smith, B., Hlynialuk, C., Zahs, K., Ramsden, M., Cleary, J., Ashe, K.H., 2016. Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory. *Nat. Med.* 22, 1268–1276. <https://doi.org/10.1038/nm.4199>
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X., 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80501-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80501-2)

## 10. Přílohy

1. **Kalabova, D.**, Smidova, A., Petrvalska, O., Alblova, M., Kosek, D., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2017. Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 493, 940–945. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.116>
2. Smidova, A.\* , Alblova, M.\* , **Kalabova, D.\*** , Psenakova, K., Rosulek, M., Herman, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2018. 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2. *FEBS J* 285, 4196–4213. <https://doi.org/10.1111/febs.14670>
3. **Kalabova, D.\*** , Filandr, F.\* , Alblova, M., Petrvalska, O., Horvath, M., Man, P., Obsil, T., Obsilova, V., 2020. 14-3-3 protein binding blocks the dimerization interface of caspase-2. *FEBS J* 287, 3494–3510. <https://doi.org/10.1111/febs.15215>
4. Psenakova, K., Petrvalska, O., Kylarova, S., Lentini Santo, D., **Kalabova, D.**, Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T., 2018. 14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK2). *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862, 1612–1625. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.006>

\* sdílené první autorství

